

**Effekte von  
Johanniskrautextrakt und anderen Antidepressiva  
auf die Funktion und Expression von P-Glykoprotein  
sowie die Plasma-Hirn-Verteilung von Corticosteron**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Apothekerin  
Claudia-Carolin Weber  
aus Hagen (Westfalen)

Frankfurt (2005)  
(D F 1)\*

\*(D F 1: D = Dissertation / F 1 = Bibliothekskennzeichen)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

**Dekan:** Prof. Dr. Harald Schwalbe

**Gutachter:** Prof. Dr. Walter E. Müller

Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

**Datum der Disputation:** 18.11.2005

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGEN

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Definition der Depression</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Antidepressiva und Antipsychotika</b>	<b>4</b>
1.2.1	Allgemeines	4
1.2.2	Antidepressiva	4
1.2.2.1	Tricyclische Antidepressiva	6
1.2.2.2	Tetracyclische Antidepressiva	7
1.2.2.3	Selektive-Serotonin-Wiederaufnahmehemmer SSRI	7
1.2.2.4	Selektive-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer SNRI	8
1.2.3	Antipsychotika	8
<b>1.3</b>	<b>Johanniskrautextrakt</b>	<b>10</b>
1.3.1	Zusammensetzung und Anwendung	10
1.3.2	Wirkmechanismus	10
1.3.3	Verhaltenspharmakologische Wirkung des Extraktes	11
1.3.4	Nebenwirkungen	12
1.3.5	Klinische Wirksamkeit	12
<b>1.4</b>	<b>Glucocorticoid-Rezeptor Theorie der Depression</b>	<b>15</b>
1.4.1	Allgemeines	15
1.4.2	Regulation der HPA-Achse	15
1.4.3	HPA-Achse und Depression	19
<b>1.5</b>	<b>P-Glykoprotein</b>	<b>21</b>
1.5.1	Allgemeines	21
1.5.2	Expression, Aufbau, Funktion und Distribution	21
1.5.2.1	Aufbau und Funktion	21
1.5.2.2	Expression	24
1.5.2.3	Lokalisation	25

---

1.5.3	Modulation der Transportaktivität von P-Glykoprotein	30
<b>1.6</b>	<b>Membranständige Transporter und HPA-Achsen-Funktion</b>	<b>32</b>
<b>1.7</b>	<b>In-vitro Zellsysteme</b>	<b>36</b>
1.7.1	Schweinehirnkapillar-Endothelzellen	37
1.7.2	Lymphoblastomzellen	37
<b>1.8</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>39</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Substanzen</b>	<b>41</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	41
2.1.2	Verwendete Kits	43
2.1.3	Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen	43
2.1.3.1	Pufferlösungen	43
2.1.3.2	Kulturmedien	45
2.1.4	Sonstige Lösungen	47
<b>2.2</b>	<b>Untersuchte Substanzen</b>	<b>48</b>
2.2.1	Antidepressiva	48
2.2.1.1	Johanniskraut	48
2.2.1.2	Charakterisierung der Extrakte	48
2.2.1.3	Tricyclische Antidepressiva	49
2.2.1.4	Tetracyclische Antidepressiva	49
2.2.1.5	SSRI	49
2.2.1.6	SNRI	49
2.2.2	Neuroleptika	49
2.2.3	Corticoide	49
2.2.4	Lösungsmittel	50
<b>2.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>51</b>
<b>2.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>52</b>
2.4.1	Vorarbeiten für die Zellkultur	52
2.4.2	Isolierung von PBCEC	52

---

2.4.3	Kultivierung der PBCEC	55
2.4.4	Kultivierung der CEM und VLB-Zellen	57
<b>2.5</b>	<b>Calcein-AM-Assay</b>	<b>57</b>
2.5.1	Das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem	57
2.5.2	Messung an PBCEC-Zellen	59
2.5.3	Messung an CEM und VLB Zellen	60
2.5.4	Methodenvalidierung	62
2.5.5	Darstellung der Ergebnisse	62
<b>2.6</b>	<b>ATP-Assay</b>	<b>64</b>
2.6.1	Messung an PBCEC-Zellen	64
2.6.2	Messung an CEM und VLB-Zellen	65
<b>2.7</b>	<b>LDH-Assay</b>	<b>66</b>
2.7.1	Messung an PBCEC-Zellen	67
2.7.2	Messung an CEM und VLB-Zellen	68
<b>2.8</b>	<b>Behandlungsstudie an Mäusen</b>	<b>68</b>
2.8.1	Tierhaltung und Behandlung	69
2.8.2	Akutstudien	70
2.8.3	Subchronische Studien	70
<b>2.9</b>	<b>Corticosteron-Assay</b>	<b>71</b>
<b>2.10</b>	<b>Western Blot</b>	<b>73</b>
2.10.1	Probenaufarbeitung	73
2.10.1.1	CEM- und VLB-Zellen	73
2.10.1.2	Behandelte CEM- und VLB-Zellen	73
2.10.2	Hirnhomogenat von Mäusen	74
2.10.3	Gelelektrophorese	74
2.10.4	Blot	74
2.10.5	Detektion	75
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>76</b>

<b>3.1</b>	<b>Beeinflussung der Transportaktivität von P-Glykoprotein in zwei Zellmodellen</b>	<b>79</b>
3.1.1	Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe	81
3.1.1.1	Extrakt	81
3.1.2	Hauptinhaltsstoffe	82
3.1.3	Tricyclische Antidepressiva	86
3.1.4	SSRI und SNRI	89
3.1.5	Tetracyclika	91
3.1.6	Antipsychotika	93
3.1.7	Corticoide	95
<b>3.2</b>	<b>Einfluss auf den intrazellulären ATP-Spiegel</b>	<b>98</b>
3.2.1	Johanniskrautextrakt	99
3.2.2	Tricyclische Antidepressiva	101
3.2.3	SSRI und SNRI	102
3.2.4	Antipsychotika	103
3.2.5	Gegenüberstellung ATP- und Calcein-AM-Assay	103
<b>3.3</b>	<b>Zelltoxische Effekte</b>	<b>105</b>
<b>3.4</b>	<b>Beeinflussung der Expression von P-Glykoprotein im zellulären System</b>	<b>107</b>
3.4.1	Johanniskrautextrakt	109
3.4.2	Hyperforin	110
3.4.3	Quercetin	111
<b>3.5</b>	<b>Ergebnisse der Behandlungsstudien</b>	<b>112</b>
3.5.1	Expression von P-Glykoprotein	115
3.5.2	Corticosteronspiegel	116
3.5.2.1	Kontrollgruppen	116
3.5.2.2	Behandelte Gruppen	118
3.5.3	Tabellarische Zusammenfassung	123
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>125</b>
<b>4.1</b>	<b>Glucocorticoide</b>	<b>127</b>

<b>4.2</b>	<b>Modulation der Transportaktivität von P-Glykoprotein und daraus resultierende mögliche antidepressive Wirkung</b>	<b>128</b>
4.2.1	Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe	129
4.2.1.1	Extrakt, Hyperforin und Hypericin	129
4.2.1.2	Flavonoide	131
4.2.1.3	Zusammenfassung	132
4.2.2	Andere Antidepressiva	133
4.2.2.1	Tricyclika	133
4.2.2.2	SSRI	135
4.2.2.3	SNRI	137
4.2.2.4	Tetracyclika	137
4.2.2.5	Zusammenfassung	137
4.2.3	Antipsychotika	139
4.2.4	Inhibition von Pgp und intrazellulärer ATP-Spiegel	142
<b>4.3</b>	<b>Veränderung der Expression von P-Glykoprotein in-vitro und in-vivo</b>	<b>143</b>
4.3.1	<i>In-vitro</i>	143
4.3.2	In-vivo	144
4.3.3	Zusammenfassung	147
<b>4.4</b>	<b>Corticosteron-Konzentrationen in Plasma und Hirn nach akuter und subchronischer Gabe von verschiedenen Antidepressiva</b>	<b>148</b>
4.4.1	Johanniskrautextrakt	149
4.4.2	Amitriptylin	151
4.4.3	Fluoxetin	152
4.4.4	Mirtazapin	153
4.4.5	Zusammenfassung der Corticosterondaten	154
<b>4.5</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	<b>157</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>159</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>162</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNISSE DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</b>	<b>178</b>

<b>7.1</b>	<b>Abbildungen</b>	<b>178</b>
------------	--------------------	------------

<b>7.2</b>	<b>Tabellen</b>	<b>180</b>
------------	-----------------	------------

## **PUBLIKATIONEN**

## **DANKSAGUNG**

## **LEBENS LAUF**



## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	micromolar
5-HT	Serotonin
ABC	ATP-binding-cassette
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BBB	Bluthirnschranke
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CBG	Corticosteron-binding-Globulin
CEM	CCRF-CEM, Lymphoblastomzellen
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
D	Dopamin
Dex/CRH Test	kombinierter Dexamethason-CRH-Test
dl	Deciliter
DSM	diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen
DST	Dexamethason-Suppressions Test
EC	effective concentration
EIA	Enzyme-Immuno-Assay
EPS	extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen
FST	forced swimming test nach Porsold
g	Gramm
GI-Trakt	Gastrointestinal Trakt
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
h	Histamin
HAMD	Hamilton Depressions Skala
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
ICD10	international classification of diseases 10. Ausgabe
kDa	kilo Dalton

---

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
MDR	multidrug resistance
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
MR	Mineralocorticoidrezeptor
Mrp	multidrug resistance associated protein
NA	Noradrenalin
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
OPC	oligomere Procyanidine
PBCEC	porcine brain capillary endothelial cells
Pgp	P-Glykoprotein
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RPM	Rounds per minute
SNRI	selective noradrenalin reuptake inhibitor
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
TDM	therapeutisches Drug-Monitoring
VLB	CEM/VLB-100, multidrug resistente Lymphoblastomzellen
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 *Definition der Depression*

Depressionen zählen zu den häufigsten psychischen Erkrankungen und sind mit großem Leidensdruck und hohen wirtschaftlichen Kosten verbunden. Unter einer Depression versteht man eine den Lebensumständen nicht entsprechende und damit unbegründete psychische Verstimmung mit einer Einschränkung der Affektivität. Weltweit leiden etwa 340 Millionen Menschen an einer Depression - depressive Störungen unterschiedlicher Ausprägung gehören zu den häufigsten Erkrankungen überhaupt. Im Jahre 2000 stand die unipolare Depression auf Platz 4 der weltweit wichtigsten Krankheiten. Bis zu 17% der Erwachsenen in der BRD sind betroffen. Aber nur 60-70% befinden sich in hausärztlicher Behandlung. Nur bei einem Drittel ist die Krankheit richtig diagnostiziert und die Wenigsten werden ausreichend therapiert. Die Patienten leiden oft für mehrere Wochen oder Monate unter gedrückter Stimmung, Interessen- und Freudlosigkeit sowie Antriebsminderung. Hinzu kommen oft der Verlust von Konzentration und Aufmerksamkeit, schwindendes Selbstwertgefühl, Schuldgefühle, Appetitlosigkeit und Gedanken an den Tod oder an Selbsttötung. Schlafstörungen gelten als eines der Leitsymptome bei depressiven Patienten. Neben dem persönlichen Leid, das ebenfalls die Familie und die engere Umgebung eines Patienten umfasst, führen depressive Störungen durch hohe Ausfallszeiten der Patienten zu teils beträchtlichen Belastungen der Volkswirtschaft <sup>1</sup>.

Depressionen wurden früher in verschiedene meist ätiopathogenetisch erklärte Depressionsformen (organische, symptomatische, neurotische, reaktive und endogene) unterteilt. Diese Unterteilung wurde inzwischen weitgehend verlassen, weil eine genaue Differenzierung häufig nicht möglich ist und sich die ätiopathogenetische Kausalität nicht bestätigen ließ. Heute werden sie nur noch nach der Häufigkeit (erste oder wiederholte, rezidivierende depressive Periode) und dem Schweregrad eingeteilt. Der Schweregrad einer Episode wird durch die Anzahl der vorhandenen Haupt- und Nebensymptome bestimmt.

Tabelle 1-1 gibt Auskunft über die Hauptsymptome und andere häufige Symptome.

**Tabelle 1-1: Hauptsymptome und andere häufige Symptome von depressiven Störungen nach ICD10**

Hauptsymptome	andere häufige Symptome
gedrückte Stimmung	Konzentrationsstörung
Interessen-/Freudlosigkeit	mangelndes Selbstwertgefühl
Antriebsstörung	Schuldgefühle
	Selbstschädigung
	Schlafstörungen
	Appetitminderung

- Leichte depressive Episode: 2 Hauptsymptome + 2 andere häufige Symptome
- Mittelgradige depressive Episode: 2 Hauptsymptome und 3-4 andere häufige Symptome
- Schwere depressive Episode: 3 Hauptsymptome und 3-4 andere häufige Symptome

Von der unipolaren Depression wird die bipolare Störung unterschieden. Menschen mit einer bipolaren Störung erleben sowohl die Tiefen der Depression als auch die Höhen der Manie. Viele beschreiben ihr Leben als emotionale Achterbahn. Im Gegensatz zu der lastenden Schwermut der Depression beherrscht bei der Manie eine erregte, unangemessene und übertriebene Hochstimmung eine Person. Die Symptome einer manischen Episode zeigen sich in denselben Bereichen wie die der Depression – Emotion, Motivation, Verhalten, Kognition und im körperlichen Bereich – doch in fast diametral entgegengesetzter Weise <sup>2</sup>.

Menschen, deren Stimmung chronischer, aber in einem weniger ausgeprägten Maß beeinträchtigt ist, erhalten die Diagnose dysthyme Störung. Hierbei liegen typischerweise als Hauptsymptom eine depressive Verstimmung und zwei bis drei Nebensymptome vor, wobei die depressive Verstimmung seit mindestens zwei Jahren an anhält <sup>2</sup>.

Es gibt verschiedene Hypothesen, die die Entstehung von Depressionen erklären. Eine von ihnen ist die sogenannte Glucocorticoid-Rezeptor Theorie der Depression, welche im Folgenden (1.3) ausführlich beschrieben wird und auf der die vorliegende Arbeit aufbaut. Eine weitere Hypothese ist die Monoaminmangel-Hypothese der Depression. Sie versucht eine Depression durch eine Verminderung der noradrenergen und/oder serotonergen Neurotransmission im ZNS zu erklären. Duman dagegen versucht die Depression mit neurodegenerativen Veränderungen im Hippocampus und frontalen Cortex zu erklären<sup>3</sup>.

## **1.2 Antidepressiva und Antipsychotika**

### **1.2.1 Allgemeines**

Zum heutigen Zeitpunkt gibt es eine Vielzahl von Therapiemöglichkeiten der Depression. Für jeden Patienten muss individuell bestimmt werden, ob eine Psychopharmakotherapie und/oder eine Psychotherapie angebracht ist. Es gibt sowohl Patienten die eine Pharmakotherapie grundsätzlich ablehnen, als auch Patienten, die niemals zu einer Psychotherapie bereit sind. Prinzipiell sind beide Therapieprinzipien effizient und eine Kombination sehr sinnvoll.

An dieser Stelle werden nicht nur Antidepressiva vorgestellt, sondern auch Antipsychotika, da in der vorliegenden Arbeit drei antipsychotisch wirksame Substanzen als Vergleichssubstanzen dienen.

### **1.2.2 Antidepressiva**

Unter Antidepressiva versteht man Wirkstoffe, die das depressive Syndrom zu lindern vermögen. Sie wirken substanzunabhängig, das heißt unabhängig von der chemischen Struktur und Klasse, in unterschiedlichem Ausmaß depressionslösend bzw. stimmungsaufhellend sowie psychomotorisch dämpfend bzw. sedierend. Der exakte Wirkungsmechanismus der Antidepressiva ist noch nicht geklärt. Es existieren jedoch zahlreiche experimentelle Befunde, die zeigen, dass Antidepressiva akute Effekte auf einige Neurotransmitter-Stoffwechsel haben sowie ebenfalls zu adaptiven Veränderungen dieser führen (Tabelle 1-2). Der exakte Wirkmechanismus ist – wie oben erwähnt - nicht bekannt. Wir wissen heute, dass fast alle Antidepressiva in die synaptische Kommunikation der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin im ZNS eingreifen (Tabelle 1-2), wobei allerdings unterschiedliche biochemische Wege ausgenutzt werden. Wie man der Tabelle entnehmen kann, führen die meisten Antidepressiva zumindest initial zu einer vermehrten Bereitstellung von Noradrenalin und Serotonin in den Synapsen. Die Erhöhung der Konzentrationen dieser Neurotransmitter lässt sich auf unterschiedliche Weisen erzeugen:

- vermehrte Ausschüttung der NT
- verminderter Abbau der NT
- verminderter Rücktransport der NT in den präsynaptischen Teil

Dieser letztgenannte biochemisch wichtige Transportweg, die Hemmung von Transportproteinen, wird von den meisten Antidepressiva genutzt. Sie hemmen entweder unselektiv Transporter für Noradrenalin und Serotonin, oder aber nur für einen dieser Neurotransmitter.

**Tabelle 1-2: Akute Effekte und adaptive Veränderungen durch Antidepressiva nach Müller WE 2000**

Akute Effekte	Adaptive Veränderungen
NA-Wiederaufnahmehemmung	Beta-down Regulation
5-HT-Wiederaufnahmehemmung	Alpha1-Upregulation
MAO-Hemmung	5-HT2-Downregulation
Alpha-2-Blockade	5-HT1-Empfindlichkeitszunahme
5-HT1A-Aktivierung	D2-Empfindlichkeitszunahme
	D1-Downregulation

Aufgrund der verschiedenen Wirkmechanismen unterscheidet man folgende Klassen von Antidepressiva:

- Nichtselektive Serotonin/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer mit zusätzlichen Neurotransmitterrezeptoren-blockierenden Eigenschaften, im folgenden als Tricyclika bezeichnet
- Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer SSRI
- Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer SNRI
- Selektive Serotonin- und Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer SSNRI
- Noradrenalin- und Serotonin-spezifische Antidepressiva NaSSA
- Dual-serotoninerge Antidepressiva DSA
- Reversible Inhibitoren der Monoaminoxidase-A RIMA

Die älteren Tricyclika haben aufgrund zusätzlicher Rezeptorprofile zahlreiche Nebenwirkungen. Die neueren, selektiveren Klassen weisen ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsspektrum auf.

Im folgenden werden diejenigen Klassen von Antidepressiva näher vorgestellt, aus denen in dieser Arbeit Substanzen untersucht wurden.

#### **1.2.2.1 Tricyclische Antidepressiva**

Die tricyclischen Antidepressiva gehören zu den Serotonin-/Noradrenalin Wiederaufnahmehemmern mit zusätzlichen Rezeptorprofilen. Außer ihrer Wirkung auf die depressiven Zielsymptome besitzen sie einen anticholinergen Effekt, durch den ein Teil der Nebenwirkungen erklärt werden kann. Der Wirkungseintritt erfolgt erst nach zwei- bis dreiwöchiger Therapie, die anticholinergen Effekte hingegen treten sofort ein. Einzelne Vertreter dieser Substanzklasse können teilweise stärker den Noradrenalinreuptake hemmen (Desipramin) oder stärker die Serotoninwiederaufnahme inhibieren (Clomipramin). Aus dieser Klasse wurden folgende Substanzen getestet:

- Amitriptylin
- Imipramin
- Clomipramin
- Nortriptylin
- Desipramin
- Opipramol

Opipramol nimmt als atypisches Tricyclikum eine Sonderstellung innerhalb dieser Gruppe ein. Biochemisch handelt es sich bei dieser Substanz um einen Sigma-Liganden <sup>4</sup>. Es zählt zwar strukturell zu den Tricyclika, hat aber nicht deren charakteristische Wiederaufnahmehemmende Komponente. Es wird zudem vermehrt als Anxiolytikum und weniger als Antidepressivum eingesetzt. Es gibt in der letzten Zeit vermehrt Hinweise, dass Sigma-Rezeptoren an anxiolytischer und antidepressiver Wirksamkeit beteiligt sind.



### **1.2.2.2 Tetracyclische Antidepressiva**

Hierbei handelt es sich um eine heterogene Klasse von Antidepressiva. Einzelne Vertreter haben ein ähnliches Wirkspektrum wie die Tricyclika, andere ein völlig anderes Spektrum. Mianserin, ein NA-Reuptake-Inhibitor, und Mirtazapin, welches keinen Effekt mehr auf den NA-Reuptake hat, blockieren präsynaptische  $\alpha$ -2 Adrenorezeptoren. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Noradrenalin und Serotonin. Von beiden ist zusätzlich eine unterschiedlich stark ausgeprägte 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> und H<sub>1</sub> Blockade bekannt. Anticholinerge Effekte sind weniger ausgeprägt als bei den Tricyclika. Aus dieser Substanzklasse wurde Mirtazapin untersucht.

### **1.2.2.3 Selektive-Serotonin-Wiederaufnahmehemmer SSRI**

Das Wirkspektrum innerhalb dieser Substanzklasse ist sehr ähnlich. Alle Substanzen wirken nicht sedierend auf den depressiven Patienten. Pharmakokinetische Unterschiede bestehen bezüglich der unterschiedlichen Hemmung von Cytochromen, wodurch es zu unterschiedlichen Arzneimittelwechselwirkungen kommen kann. Da Cytochrome und Pgp ein teilweise überlappendes Substratspektrum haben, ist es möglich, dass sich aus dieser Tatsache auch eine unterschiedliche Hemmwirkung auf die Transportaktivität von Pgp zeigt. Auch dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Aufgrund ihrer günstigen therapeutischen Eigenschaften werden SSRIs häufig verwendet. Fluoxetin ist das weltweit am häufigsten verordnete Antidepressivum. Aus dieser Substanzklasse wurden folgende Antidepressiva untersucht:

- Fluoxetin
- Citalopram

#### **1.2.2.4 Selektive-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer SNRI**

Mit Substanzen, die nur den Noradrenalinreuptake hemmen, lässt sich eine antidepressive Wirkung erreichen, die der einer gleichzeitigen Serotonin- und Noradrenalinwiederaufnahmehemmung gleicht. Aus dieser Substanzklasse wurde Reboxetin untersucht.

### **1.2.3 Antipsychotika**

Früher wurden Antipsychotika häufig als Neuroleptika bezeichnet. Es handelt sich um Substanzen, die - insbesondere bei an Schizophrenie erkrankten Personen – psychotische Symptome bessern, ohne das Bewusstsein und die intellektuellen Fähigkeiten wesentlich zu beeinflussen. Sie dämpfen psychomotorische Erregungszustände und verringern affektive Spannungen, Angst und Trugwahrnehmung. Der gemeinsame Wirkungsmechanismus aller Antipsychotika ist die D2 (und D3) rezeptorantagonistische Wirkung. Es besteht eine hervorragende Korrelation zwischen der Affinität zum Dopamin-D2-Rezeptor und der antipsychotischen Dosis am Patienten. Der D2-Antagonismus ist voll ausreichend für eine antipsychotische Wirkung, trotzdem kommt bei den sogenannten atypischen Substanzen eine Blockade anderer Rezeptoren hinzu, z. B. Clozapin blockiert in stärkerem Ausmaß D4 als D2 Rezeptoren. Da diese Dopaminrezeptoren nicht nur in Regionen vorkommen, die für die antipsychotische Wirkung wichtig sind, sondern auch noch in die Steuerung extrapyramidal-motorischer Bewegungen und der Regulation der Prolaktinfreisetzung eingreifen, kann es zu Nebenwirkungen wie Prolaktinanstieg und EPS kommen. Weitere Nebenwirkungen werden über die zusätzlichen Rezeptorprofile (z.b. M-, 5HT<sub>2</sub>-, H1-Rezeptorblockade) hervorgerufen.

Die antipsychotische Wirkung manifestiert sich langsam, im Laufe von Tagen bis wenigen Wochen. Folgende drei Hauptwirkungen werden therapeutisch genutzt:

1. Beseitigung oder Abschwächung produktiver psychotischer Symptome, also die gute Wirksamkeit gegen Plussymptome wie Denkstörungen, Wahnidee und Halluzination
2. Abschwächung der Negativsymptome schizophrener Erkrankungen, wie Verarmung der Sprache, sozialer Rückzug und Apathie
3. Sedierung auf Grund der teilweise vorhandenen Blockade von H1-Rezeptoren

Teilweise werden auch einige Antipsychotika in der Therapie von Depressionen eingesetzt. Gerade dann, wenn depressive Patienten wahnhafte Vorstellungen zeigen, kann die zusätzliche Gabe von antipsychotischen Substanzen eine Besserung der Stimmung der Patienten bewirken.

Anhand der chemischen Klassifikation kann man die Substanzen in zwei Gruppen einteilen:

- typische Antipsychotika wie die Tricyclische Antipsychotika (Phenothiazine und deren Analoga) sowie die Butyrophenone und Diphenylbutylpiperidine
- Atypische Antipsychotika

Es wurde aus jeder dieser Substanzklassen eine Substanz untersucht. Aus der Klasse der Phenothiazine Chlorpromazin, Haloperidol aus der Klasse der Butyrophenone und als atypisches Neuroleptikum Clozapin (Antagonist an Muskarin, 5-HT<sub>2A</sub> und D<sub>4</sub> Rezeptoren).

### **1.3 Johanniskrautextrakt**

#### **1.3.1 Zusammensetzung und Anwendung**

Johanniskrautextrakte werden aus dem getrockneten Kraut von *Hypericum perforatum* L. hergestellt. Johanniskrautextrakt wird heutzutage häufig in der Therapie von milder bis mittelstarker Depression eingesetzt. Außerdem wird es häufig in der Selbstmedikation bei psychovegetativen Störungen, nervöser Unruhe und Angst angewendet. Es stellt eine sinnvolle und akzeptierte Alternative zu den mit größeren Nebenwirkungen behafteten synthetischen Antidepressiva dar, denn Johanniskrautextrakt weist wesentlich weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf. Bei Johanniskrautextrakt handelt es sich um ein Vielstoffgemisch. Im Extrakt sind u.a. enthalten: Phloroglucinolderivate wie Hyperforin und Adhyperforin, die Naphtodianthrone Hypericin und Pseudohypericin und Flavonide wie Hyperosid, Quercetin, Biapigenin und Rutin. Für die Herstellung von Extrakten ist es besonders wichtig Verfahren anzuwenden, die es ermöglichen, dass die für die Wirksamkeit notwendigen Inhaltsstoffe des Extraktes in ausreichender Menge in jeder Charge des Extraktes enthalten sind, um einen gleichbleibenden therapeutischen Erfolg zu gewährleisten.

#### **1.3.2 Wirkmechanismus**

Der genaue Wirkungsmechanismus ist bis heute nicht geklärt, jedoch konnten zahlreiche Untersuchungen vielfältige Wirkungen des Extraktes nachweisen. Die Erkenntnis, dass es sich bei dem Extrakt um einen Inhibitor der MAO-A handelt, konnte jedoch nicht aufrecht erhalten werden. Neuere Untersuchungen zeigen eine halbmaximale Hemmkonstante deutlich über 100 µg/ml. Diese Hemmung kann daher keine physiologische Relevanz besitzen. Demgegenüber stehen einige neuere Befunde, die zeigen, dass Johanniskrautextrakt den synaptosomalen Reuptake von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, GABA und L-Glutamat hemmt <sup>5</sup>. Die halbmaximalen Hemmkonstanten an diesen Transportern sind wesentlich geringer als bei der MAO (5-HT-Aufnahme: 2 µg/ml; Dopamin-Aufnahme: 1 µg/ml; NA-Aufnahme: 5 µg/ml; GABA-Aufnahme: 1 µg/ml; L-Glutamat-Aufnahme: 21 µg/ml) <sup>6</sup>. Keines der bekannten

Standardantidepressiva zeigt ein ähnlich breites Wirkspektrum wie Johanniskrautextrakt. Alle anderen Antidepressiva sind entweder spezifisch für nur ein System oder zeigen überschneidende Hemmeffekte an maximal zwei der untersuchten Systemen. Es ist bis dato kein anderes Antidepressivum bekannt, welches – so wie Johanniskrautextrakt – eine in etwa gleiche Hemmwirkung auf die synaptosomale Aufnahme aller fünf Neurotransmitter aufweist.

Der Extrakt zeigt jedoch nicht nur *in-vitro* eine antidepressive Wirkung sondern auch *in-vivo* analoge Veränderungen der Transmitterkonzentrationen. Eine subchronische Behandlung von Ratten mit standardisiertem Extrakt führt zu einer Downregulation von beta-Rezeptoren, überraschenderweise allerdings auch zu einer signifikanten Zunahme der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren im präfrontalen Kortex. Standardantidepressiva wie Imipramin führen ebenfalls zu einer Abnahme der beta-Rezeptoren, aber auch zu einer Abnahme der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren<sup>5</sup>. Die bei Johanniskrautextrakt beschriebene Upregulation der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren wird jedoch ebenfalls in der Elektrokrampftherapie gesehen, der „Ultima-Ratio“ der Depressionstherapie. Johanniskrautextrakt zeigt damit an den zentralen noradrenergen und serotonergen Synapsen ähnliche biochemische Effekte wie andere Standardantidepressiva bzw. wie andere antidepressive Therapiemaßnahmen.

### 1.3.3 Verhaltenspharmakologische Wirkung des Extraktes

In guter Übereinstimmung zur *in-vivo* und *in-vitro* Wirkung des Extraktes in verschiedenen biochemischen Modellen, konnte ebenfalls eine Wirkung in einer Reihe von verhaltenspharmakologischen Modellen gezeigt werden. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte forced-swim-test (FST) nach Porsold. Dieses Testsystem hat eine hohe Validität für den Nachweis antidepressiver Effekte und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für diese Indikation aus. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten innerhalb dieses Modells eine Wirksamkeit von Johanniskrautextrakt nachweisen<sup>5</sup>. In diesen Versuchen stellte sich die Zusammensetzung des Extraktes als wichtig heraus. Es wurden inzwischen zum einen einige Reinsubstanzen getestet, zum anderen auch einige von der Zusammensetzung her veränderte Extrakte. Ein Rutin-freier

Extrakt zeigt keinerlei Wirkung im FST, während Rutin alleine nicht wirksam ist. Die Flavonoide Biapigenin, Hyperosid und Isoquercetrin allein sind im FST wirksam. Die größten Effekte lassen sich mit Hyperforin-Na erzielen: diese folgen einer linearen Dosis-Wirkungskurve. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine hyperforin-freie Johanniskrautextrakt-Fraktion im FST eine - wenn auch deutlich schwächere - Wirkung zeigt.

Diese zahlreichen Befunde weisen darauf hin, dass die antidepressive Wirkung des Extraktes nicht ausschließlich auf einen einzelnen Inhaltsstoff zurückgeführt werden kann. Aufgrund bisheriger Untersuchungen kann Hyperforin als wichtiger, wahrscheinlich sogar bedeutendster wirksamkeitsmitbestimmender Inhaltsstoff angesehen werden. Aufgrund dieser Überlegungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Inhaltsstoffe und nicht nur der Extrakt selbst untersucht.

#### **1.3.4 Nebenwirkungen**

Die Nebenwirkungen unter der Therapie sind sehr gering. Allerdings kann es zu vielfältigen Arzneimittelinteraktionen kommen. Es ist bekannt, dass Inhaltsstoffe des Extraktes in der Lage sind sowohl Cytochrome als auch Pgp zu induzieren. Jedoch ist nicht bekannt, welcher Inhaltsstoff dafür verantwortlich ist oder ob vielleicht mehrere Inhaltsstoffe einen Effekt auf P-Glykoprotein (Pgp) haben. Außerdem sind kurzzeitige Effekte auf die Funktion von Pgp ebenfalls nicht bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, welche Inhaltsstoffe des Extraktes mit der Transportaktivität von Pgp wechselwirken.

#### **1.3.5 Klinische Wirksamkeit**

Die klinische Wirksamkeit von Johanniskrautextrakt in der Therapie depressiver Erkrankungen wurde inzwischen in zahlreichen Studien sehr gut belegt. Es gibt jedoch auch Studien, die die Wirksamkeit des Extraktes in Frage stellen. So kommen Shelton et al. zu dem Schluß, dass es keinen Unterschied zwischen Johanniskraut- und Placebo-behandelten Patienten gibt. Aber auch diese Studie bleibt nicht ohne Wirksamkeitsbeleg für Johanniskraut: wenn man sich die Remissionsraten unter Placebo und Verum anschaut <sup>7</sup>. Allerdings wurden

nur schwer kranke Patienten eingeschlossen, die nach dem heutigen Stand der Wissenschaft eindeutig keine Zielgruppe für eine Johanniskrauttherapie darstellen, zudem fehlt eine Kontrollgruppe. Aufgrund dieser methodischen Mängel sollte die Studie von Shelton also nicht überbewertet werden. Die Kernaussage der Studie ist jedoch dahingehend zu akzeptieren, als dass Johanniskrautextrakt keine Therapiealternative für schwere und chronisch depressive Patienten darstellt. Im Gegensatz dazu zeigten Kalb et al., dass ein hyperforinhaltiger Johanniskrautextrakt Placebo signifikant überlegen ist <sup>8</sup>. Es kam in dieser Studie auch innerhalb der Placebogruppe zu Responderraten von 40% - hierbei handelt es sich um ein gängiges Problem in Studien mit Antidepressiva. Nicht nur Überlegenheit über Placebo, sondern ebenfalls eine sehr gute Verträglichkeit wurde mit dieser Studie belegt. Auch Lecrubier et al. konnten – bei deutlicher Placebo-Response – eine Überlegenheit von Johanniskrautextrakt mit einem signifikanten Vorteil auf der Hamilton-Skala zum Endpunkt der Studie sehen <sup>9</sup>. 1996 veröffentlichten Linde et al. eine erste systematische Übersicht und Meta-Analyse über die bis dato verfügbaren klinischen Studien. Diese Analyse wurde 2003 von den selben Autoren erneuert. Es wurden 27 randomisierte klinische Studien, die entweder Johanniskrautextrakt mit Placebo oder mit einem Standardantidepressivum verglichen haben, eingeschlossen. Linde et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Johanniskrautextrakt signifikant überlegen ist gegenüber Placebo und gleichwertig gegenüber Standardantidepressiva. Die Responderraten waren: 56% Johanniskrautextrakt gegenüber 25% Placebo und 50% Johanniskrautextrakt gegenüber 52% Standardantidepressivum <sup>10</sup>. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die unerwünschten Arzneimittelwirkungen gelegt. Hier zeigt sich Johanniskrautextrakt gegenüber Standardantidepressivum überlegen <sup>10</sup>. Eine kürzlich erschienene Studie vergleicht Johanniskrautextrakt mit Paroxetin, einem SSRI, bei mittelschwerer bis schwerer Depression. Szegedi et al. kommen zu dem Ergebnis, dass Johanniskrautextrakt genauso wirksam wie Paroxetin, dabei aber eine besser Verträglichkeit aufweist <sup>11</sup>. Eine weitere neuere Studie testet Johanniskrautextrakt gegen Sertralin, ebenfalls ein SSRI. Gastpar et al. fanden in dieser Studie keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und beide Substanzen erwiesen sich als gut bis sehr gut

verträglich <sup>12</sup>. Demnach zeigen auch Studien mit Johanniskrautextrakten und neueren Antidepressiva eine gute Wirksamkeit des Extraktes.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die gute akute Wirksamkeit von Johanniskrautextrakt bei der Behandlung der leichten bis mittelschweren Depression sehr gut belegt ist. Man muß jedoch auch hervorheben, dass der Extrakt bei schweren Depressionen nicht verschrieben werden sollte und dass valide Daten zur Langzeitwirksamkeit derzeit noch nicht verfügbar sind. Ein großer Vorteil liegt in der großen Akzeptanz bei den Patienten, welche nicht zuletzt durch die gute Verträglichkeit und geringe Nebenwirkungsrate bestimmt wird.



## **1.4 Glucocorticoid-Rezeptor Theorie der Depression**

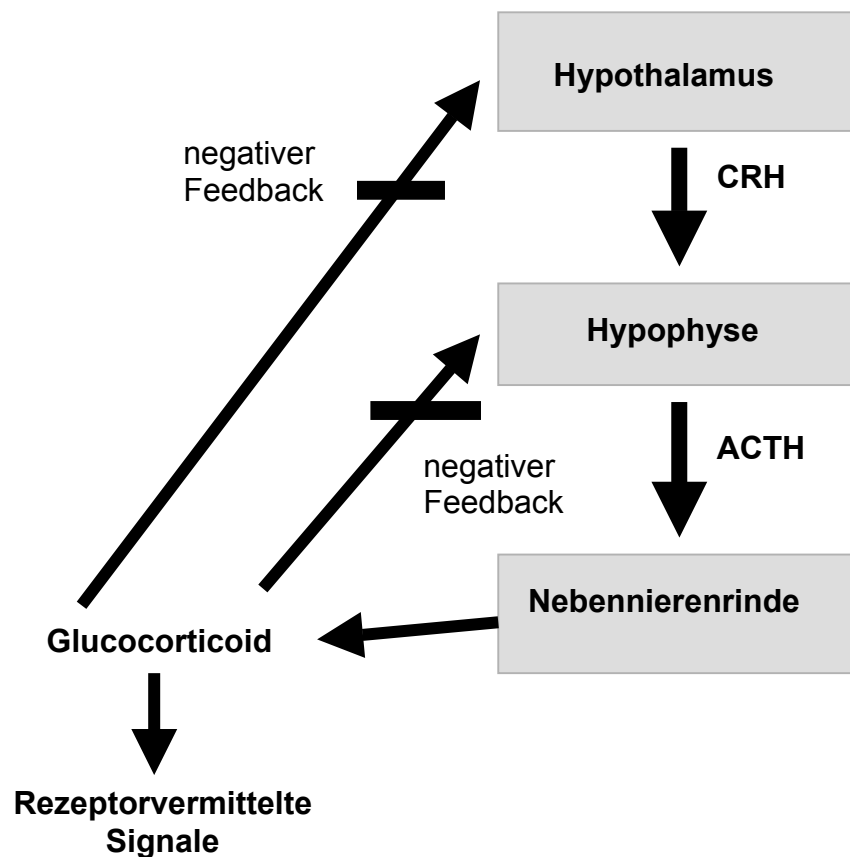
### **1.4.1 Allgemeines**

Glucocorticoide werden in der Zona fasciculata und in der Zona reticularis der Nebennierenrinde gebildet. Sie beeinflussen vor allem Stoffwechselprozesse und Abwehrmechanismen, unter anderem den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Im Gehirn führen sie zu einer Steigerung der Erregbarkeit gegenüber sensorischen Reizen und können sowohl eine euphorisierende als auch eine depressionsauslösende Wirkung haben. Ihre Konzentration im Blut wird durch einen hormonellen Regelkreislauf kontrolliert. Die Regelgröße ist dabei in erster Linie die Konzentration des freien Cortisols im Blut. Dieser Sollwert ist allerdings in gewissen Grenzen variabel. Die Cortisolkonzentration weist tagesrhythmische Schwankungen mit einem Maximalwert am frühen Morgen und einem Minimalwert am späten Abend auf.

### **1.4.2 Regulation der HPA-Achse**

Bei einer Abnahme der Konzentration an freiem Cortisol im Blut wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) aktiviert und die Sekretion von Corticotropin-releasing Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin aus dem Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus angeregt. Im Hypothalamus liegen die übergeordneten vegetativen Zentren, die einerseits die Aktivität von Sympathikus und Parasympathikus und andererseits die Hormonabgabe der Hypophyse beeinflussen. Hypothalamus und Hypophyse bilden zusammen eine übergeordnete Funktionseinheit für die hormonale Regulation. Die Ausschüttung von CRH ist durch die Neurotransmitter Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) reguliert. CRH aktiviert in der Hypophyse die Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), welches wiederum die Sekretion von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde bewirkt. Beim Menschen ist das Hauptglucocorticoid Cortisol, beim Nager handelt es sich um Corticosteron <sup>13,14</sup>. Diese Glucocorticoide reagieren dann mit entsprechenden Glucocorticoidrezeptoren (GR) und Mineralocorticoidrezeptoren (MR) in verschiedenen Zielgeweben. Unter anderem regen sie einen negativen Feedbackmechanismus an. Sie inhibieren

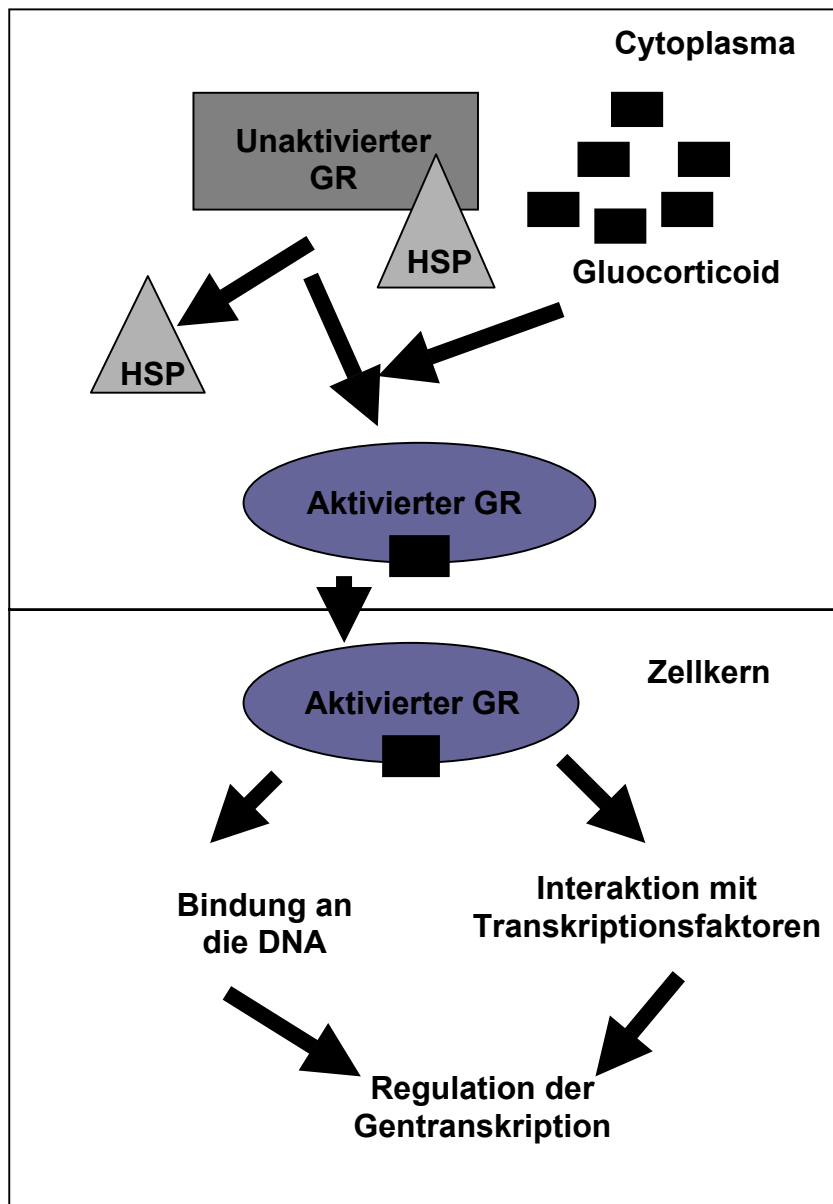
im Hypothalamus die Sekretion von CRH und in der Hypophyse die Ausschüttung von ACTH – sie regulieren also ihre Ausschüttung selbst. Dieser Regelkreis ist schematisch in Abb. 1-1 dargestellt. Im Plasma sind die Glucocorticoide zu einem großen Anteil an Corticostoid-binding Globulin (CBG) gebunden. Sie können aufgrund ihrer Molekülstruktur jedoch ungehindert Zellmembranen durch passive Diffusion überwinden. Innerhalb einer Zelle werden Glucocorticoide mittels 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase metabolisiert.



**Abb. 1-1: Regulation der Ausschüttung von Glucocorticoiden**

Aus dem Hypothalamus wird CRH ausgeschüttet, welches in der Hypophyse die Sekretion von ACTH bewirkt. Durch ACTH wird wiederum in der Nebennierenrinde Cortisol oder Corticosteron als Glucocorticoid ausgeschüttet. Diese Glucocorticoide üben dann rezeptorvermittelte Signale aus, wie z.B. die Inhibition der Ausschüttung von CRH und ACTH

Die beiden Steroid-Rezeptoren haben unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Glucocorticoide. Der MR hat eine hohe Affinität für endogene Glucocorticoide sowie Aldosteron und ist wichtig für die basale Aktivität der HPA-Achse. Der GR hingegen hat eine wesentlich geringere Affinität für Glucocorticoide (aber eine hohe Affinität für exogene Glucocorticoide wie Dexamethason) und ist verantwortlich für die Regulation der Antwort des Körpers auf Stress, wenn die endogenen Glucocorticoidspiegel hoch sind. Denn dann werden bei hohen Konzentrationen von Cortisol bzw. Corticosteron nicht nur die MR sondern auch die GR besetzt. Beide Rezeptoren gehören als Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren zur Familie der Steroid-/Thyroid-Rezeptor Superfamilie <sup>14,15</sup>. Diese Rezeptoren sind im Cytoplasma der Zellen lokalisiert und in der inaktiven Form zur Stabilisierung mit Hitzeschockproteinen verbunden <sup>16</sup>. Wenn Glucocorticoide durch passive Diffusion in die Zellen eindringen und an diese Rezeptoren binden wird die Ablösung der Hitzeschockproteine induziert und der Rezeptor aktiviert. Der Ligand-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern ein. Im Zellkern regulieren Corticosteroidrezeptoren die Genexpression durch Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte Glucocorticoid-Response-Elements (GRE's). Das resultiert dann entweder in der Hochregulation der Expression entsprechender Gene oder aber auch in der Herunterregulation. Siehe auch Abb. 1-2.



**Abb. 1-2: Modell der Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors**

*Im Zellkern liegt der GR inaktiv an HSP gekoppelt vor. Bindung eines Liganden erzeugt die Ablösung des HSP und der aktivierte GR wandert in den Zellkern. Dort reguliert er die Gentranskription*

### 1.4.3 HPA-Achse und Depression

Patienten mit schwerer Depression zeigen oft eine Hyperaktivität der HPA-Achse, die möglicherweise zur Ausprägung der depressiven Symptome beiträgt<sup>16-18</sup>. Folgende Veränderungen der HPA-Achse lassen sich häufig bei depressiven Patienten beobachten:

- Erhöhung der ACTH und Cortisol Ausschüttung und Plasmakonzentration
- Erhöhung des Cortisols im 24h Urin
- Erhöhung der Konzentration von CRH in der Cerebrospinalflüssigkeit
- Erhöhung der Anzahl der CRH sekretierenden Neurone im Limbischen System des Gehirns
- Reduktion der Anzahl der CRH Bindungsstellen im frontalen Cortex
- Hypertrophie der Hypophyse und der Nebennierenrinde

Dazu kommen die Beobachtungen aus diversen neuroendokrinen Funktionstests wie dem Dexamethason-Suppressions Test (DST) oder dem kombinierten Dexamethason-CRH-Test (dex/CRH Test)<sup>19,20</sup>. Mit diesen Tests lässt sich eine Aussage über die funktionelle Integrität des GR-vermittelten Feedback auf dem Level der Hypophyse machen<sup>21</sup>. Beide messen die Konzentration von endogenem Cortisol und ACTH, welche durch das exogene Glucocorticoid Dexamethason unterdrückt werden. Im DST zeigt sich, dass eine große Anzahl depressiver Patienten erhöhte zirkulierende Cortisol-Level haben. Allerdings hat dieser Test den Nachteil, dass er nur eine geringe Sensitivität aufweist. Im dex/CRH Test werden die Patienten mit einer geringen Dosis Dexamethason vorbehandelt und erhalten dann i.v. CRH. Bei gesunden Probanden wird durch die Vorbehandlung mit Dexamethason die Antwort der Hypophyse auf CRH Gabe unterdrückt. Bei depressiven Patienten hingegen führt die gleiche Vorbehandlung zu einer verstärkten Antwort auf die CRH-Gabe: die ACTH und Cortisol Ausschüttung ist erhöht<sup>22</sup>. Beide Tests zusammen zeigen bei Depressiven eine beeinträchtigte Feedback-Inhibition auf der Ebene der Hypophyse.

Eine mögliche Erklärung für die Hyperaktivität der HPA-Achse ist eine beeinträchtigte Feedback Inhibition durch das endogene Glucocorticoid Cortisol. Dieser Feedback durch Cortisol wird über zwei verschiedene Rezeptoren im Gehirn vermittelt: den GR und den MR <sup>14</sup>. Der GR ist – wie gesagt - bei hohem zirkulierenden Cortisollevel für die Regulation der HPA-Achse wichtig. Bei schwer depressiven Patienten zeigt sich ein beeinträchtigter Feedbackmechanismus trotz erhöhtem zirkulierenden Cortisollevel <sup>13</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesen Patienten der GR beeinträchtigt ist. Diese Beeinträchtigung liegt aber nicht an einer veränderten Struktur des Rezeptors <sup>15,19</sup>. Vielmehr gibt es vermehrt Hinweise, dass die Neurotransmitter vermittelte Signaltransduktion, die die GR-Funktion reguliert, gestört ist <sup>15,19</sup>. Nicht nur die Funktion des Rezeptors scheint in depressiven Patienten gestört zu sein, sondern es gibt ebenfalls Hinweise, dass die Anzahl der Rezeptoren reduziert ist.

Bei längerer Behandlung mit Antidepressiva konnten diverse Veränderungen beobachtet werden:

- Senkung der CRH-Expression im paraventriculären Nucleus
- Erhöhung der Expression von MRs und GRs
- Erhöhung der Bindung an den MRs und GRs

Diese Ergebnisse wurden in Tierstudien erhalten <sup>18</sup>. Sie deuten darauf hin, dass Antidepressiva die beeinträchtigte Feedback-Hemmung der HPA-Achse normalisieren und dieser Effekt zu Wirksamkeit beiträgt. Allerdings konnten andere Gruppen zeigen, dass die Expression von CRH unter Gabe von Antidepressiva nicht verändert wird. Stout et al. postulieren, dass Antidepressiva die Sensitivität von Neuronen im paraventriculären Nucleus für verschiedene Formen von Stress reduzieren <sup>23</sup>. Die genaue Wirkung von verschiedenen Antidepressiva auf die HPA-Achse einschließlich Wirkungsmechanismus wird unter 1.6 näher erläutert.

## **1.5 *P-Glykoprotein***

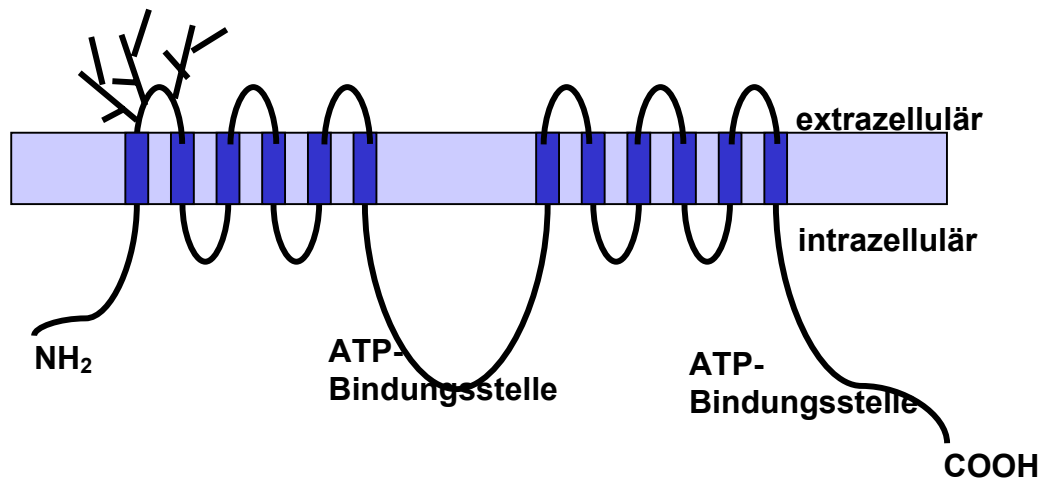
### **1.5.1 Allgemeines**

Die Entdeckung von Pgp geht auf Forschungsarbeiten zu Arzneistoff-Resistenz-Phänomenen Anfang der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts zurück. Unter anderem wurde an resistenten Tumorzellen entdeckt, dass der Mechanismus dieser Resistenz auf einem auswärtsgerichteten Transport dieser Substanzen durch membranständige Transporter beruht. 1976 wurde dieser Transporter entdeckt, charakterisiert und benannt. Der vollständige Name lautet: Permeabilitäts-Glykoprotein (P-Glykoprotein, Pgp). Mit der Entdeckung von Pgp konnte dann das Phänomen der multidrug resistance (MDR) vieler Krebserkrankungen erklärt werden. Hierbei handelt es sich um eine Cytostatika Kreuzresistenz, die auf der Überexpression von Pgp beruht. Ende der 80er Jahre wurde Pgp ebenfalls in gesundem Gewebe gefunden. Die Expression von Pgp an der BBB wurde 1988 nachgewiesen<sup>24,25</sup>.

### **1.5.2 Expression, Aufbau, Funktion und Distribution**

#### **1.5.2.1 Aufbau und Funktion**

Pgps sind große glycolysierte membranständige Proteine<sup>26</sup> mit einer Größe von 170 kDa bestehend aus 1280 Aminosäuren. Das Protein lässt sich in zwei homologe Hälften teilen, die jede 6 transmembranäre Domänen (TMD) enthalten. Beide TMDs weisen je eine Nukleotid-bindende Domäne auf, welche ATP bindet und hydrolysiert. Pgp gehört zur Klasse der ABC-Transporter, der ATP-binding-cassette Transporter<sup>27</sup>. Diese sind energieabhängig und gewinnen diese Energie aus der Hydrolyse von ATP. Es handelt sich bei diesen Transportern um eine Familie von hochkonservierten Proteinen, die in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vorkommen. Neben Pgp gehören die Proteine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) sowie die Transporter der MRP-Gruppe (multidrug resistance associated proteins) in die Familie der ABC-Transporter<sup>28</sup>. Die Struktur von Pgp ist in Abb. 1-1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1-3: Strukturelles und topologisches Model von Pgp**

Basierend auf der humanen MDR1-Sequenz. Pgp, ein 170 kDa schweres Membran-assoziiertes Protein, besteht aus zwei homologen Hälften, die jeweils 6 Transmembrandomänen und eine ATP-Bindungsstelle enthalten. Zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne sollen sich drei Glykosylierungsstellen befinden.

Pgps transportieren viele, strukturell unterschiedliche Stoffe durch aktiven Transport auch gegen einen Konzentrationsgradienten aus Zellen hinaus. Dieser Transport ist unabhängig vom elektrochemischen Membranpotential und vom Protonengradienten. Strukturell stark unterschiedlich heißt, dass Moleküle von einer Größe von 250 Da bis 1900 Da befördert werden. Diese haben wenige Gemeinsamkeiten, es werden z.B. aromatische aber auch nicht aromatische Moleküle transportiert. Am effektivsten werden basische ungeladene Moleküle transportiert, aber es werden auch einige saure Verbindungen durch Pgp aus Zellen sezerniert. Allerdings scheinen alle transportierten Moleküle amphiphil zu sein. Dies passt zum Transportmechanismus von Pgp, da man postuliert, dass es seine Substrate innerhalb der Zellmembran bindet. Als Konsequenz werden nicht nur viele endogene Substanzen wie z. B. Glucocorticoide transportiert sondern auch eine Vielzahl von exogenen Substanzen. Dazu gehören viele Arzneistoffklassen, die teilweise nicht nur selbst sezerniert werden, sondern auch noch die Funktionalität von Pgp modulieren können. Tabelle 1-3 gibt Auskunft über verschiedene Arzneistoffklassen, die mit der Transportfunktion von Pgp interagieren.



Tabelle 1-3: Modulatoren von Pgp: Arzneistoffklassen

Substanz	P-Glykoprotein
<b>Antiarrhythmika</b>	
Lidocain	Inhibitor
Chinidin	Substrat/Inhibitor
<b>Antimykotika</b>	
Itraconazol	Inhibitor
Ketoconazol	Substrat/Inhibitor
<b>Calcium-Kanal-Blocker</b>	
Diltiazem	Substrat/Inhibitor
Nifedipin	Inhibitor
Verapamil	Substrat/Inhibitor
<b>Zytostatika</b>	
Vinblastin	Substrat
Paclitaxel	Substrat
<b>Flavonoide</b>	
Kaempferol	Enhancer
Quercetin	Enhancer
<b>Hormone</b>	
Dexamethason	Substrat
Estradiol	Substrat
Hydrocortison	Substrat/Inhibitor
Progesteron	Inhibitor
Testosteron	Inhibitor
<b>Immunsuppressiva</b>	
Cyclosporin	Substrat/Inhibitor
<b>andere</b>	
Digoxin	Substrat
Erythromycin	Inhibitor
<b>Nahrung</b>	
Grapefruit-Saft	Enhancer

### 1.5.2.2 Expression

Codiert wird Pgp durch verschiedene Gene. Beim Menschen gibt es das MDR1 Pgp, welches das eigentliche multidrug resistance Pgp ist. Zusätzlich gibt es noch das MDR3 Pgp welches eine Phosphatidyltranslokase ist. Beim Nager gibt es drei verschiedene Pgps: mdr1a und mdr1b Pgp, welche zusammen der Funktion von MDR1 entsprechen. Außerdem exprimieren Nager noch das mdr2 Pgp, welches wiederum in seiner Funktion dem MDR3 vom Menschen entspricht. In dieser Arbeit wird die eben vorgestellte Nomenklatur verwendet. Es gibt jedoch eine neue Nomenklatur, die sogenannte ABC-Nomenklatur, welche in Tabelle 1-4 dargestellt wird <sup>26</sup>. Für diese Arbeit sind nur die MDR1 bzw. mdr1a/b Pgps von Bedeutung, daher wird im folgenden nicht mehr auf MDR3 Pgp eingegangen.

**Tabelle 1-4: Nomenklatur der MDR Gene**

<b>Mensch</b>		<b>Nager</b>	
<b>alte Nomenklatur</b>	<b>ABC-Nomenklatur</b>	<b>alte Nomenklatur</b>	<b>ABC-Nomenklatur</b>
MDR1	ABCB1	mdr1a mdr1b	Abcb1a Abcb1b
MDR3	ABCB4	Mdr2	Abcb4

Diverse Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Expression von Pgp genauso wie die Expression der Cytochrome durch den Pregnane-X-Rezeptor (PXR) gesteuert wird <sup>29,30</sup>. Hierbei handelt es sich um einen nukleären Rezeptor, der nach Aktivierung die Expression zahlreicher Proteine hoch- oder runterreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass der PXR-Rezeptor den Körper vor exogenen toxischen Chemikalien schützt <sup>31</sup>. Er wird durch verschiedene, strukturell unterschiedliche Substanzen aktiviert, dazu gehören zahlreiche Arzneistoffe, aber auch endogene Substanzen wie Gallensäuren und Steroide. Geick et al. konnten zeigen, dass Rifampicin die Expression von Pgp durch Wechselwirkung mit dem PXR hochreguliert <sup>32</sup>. Owen et al. konnten den Zusammenhang zwischen PXR und MDR-Pgp ebenfalls zeigen. Sie sahen eine signifikante Korrelation zwischen der Menge der MDR mRNA und der PXR mRNA in peripheren Blutzellen <sup>33</sup>.

### **1.5.2.3 Lokalisation**

Neben der Expression in Tumorzellen verschiedener Krebsarten, ist MDR1 Pgp im Magen-Darm-Trakt, in der Niere, der Leber, den Testes und auch an der Bluthirnschranke lokalisiert <sup>25,26</sup>. Die genaue physiologische Funktion von Pgp ist bis heute noch nicht bekannt, jedoch kann aus der Verteilung im Körper geschlossen werden, dass Pgp an wichtigen Barrieren im Körper eine Schutzfunktion vor potentiell toxischen Substanzen ausübt. In Tabelle 1-5 wird die Lokalisation und jeweilige Funktion von Pgp im menschlichen Körper dargestellt.

**Tabelle 1-5: Vorkommen und physiologische Funktion von Pgp***Nach Bauer 2002<sup>34</sup>*

Vorkommen	Physiologische Funktion
Intestinaltrakt	Schutzfunktion Intestinale Elimination
Leber, Niere	Elimination Detoxifikation
Bluthirnschranke	Schutzfunktion hormonales Kommunikationssystem?
Blut-Hodenschranke	
Ovarien	
Placentaschranke	Schutzfunktion
Blut-Nerven-Schranke	
Knochenmark	
Nebenniere	Steroidtransport Schutz Steroid-serzernierender Zellen
Endometrium	Steroidtransport?
<b>Immunsystem:</b>	
Lymphozyten	Zytokintransport
Natürliche Killerzellen	Transport von Perforin?
Dendritische Zellen	?
Große Arterien	Cholesterintransport?
Plexus choroideus	?
Pankreas	?
	Kombinierter Eliminationsmechanismus mit CYP 450 Systemen? Regulation der Apoptose? Lipidtransport? Regulation des Zellvolumens?

Nähere Einblicke in die Funktion von Pgp hat man durch die Generierung von knockout Mäusen bekommen. Inzwischen gibt es *mdr1a* (-/-), *mdr1b*(-/-) und auch *mdr1a/b* (-/-) Mäuse. Überraschenderweise sind alle drei knockout Mäuse lebensfähig, gesund und fruchtbar, obwohl sich ja gezeigt hat, dass Pgp an wichtigen Barrieren exprimiert wird. Sie zeigen keinerlei Abnormalitäten bezüglich der Anatomie, der Blutparameter, der Zusammensetzung der Galle und vieler anderer Parameter <sup>35</sup>. Das zeigt, dass zumindest unter Laborbedingungen Pgp nicht essentiell für die Mäuse ist. Allerdings zeigen diese knockout Mäuse nach Gabe von exogenen Pgp Substraten wie zum Beispiel Ivermectin, einem neurotoxischen Pestizid, eine völlig andere Verteilung dieser Substanzen im Körper. Nach Gabe von Ivermectin sterben nahezu alle knockout Mäuse, während die Kontrollmäuse überleben <sup>36,37</sup>. In den Kontrollmäusen wird Ivermectin mittels Pgp vor dem Eintritt in das ZNS gehindert. Diese Versuche zeigen, dass Pgp an der BBB eine wichtige Funktion erfüllt nämlich den Schutz des ZNS vor potentiell toxischen Substanzen. Diese Befunde wurden inzwischen an zahlreichen weiteren Substanzen wie zum Beispiel Loperamid <sup>38</sup> belegt. An den knockout Mäusen konnte nicht nur eine wichtige Funktion von Pgp an der BBB gezeigt werden, sondern noch weitere Funktionen. Pgp ist ebenfalls beteiligt an der Exkretion von exogen zugeführten Pgp Substraten. So sezerniert es im Magen-Darm-Trakt Stoffe in den Darm und in der Niere in den Tubulusapparat. Eine weitere Funktion liegt in der verminderten Aufnahme von Substanzen ebenfalls durch einen direkten Rücktransport ins Darmlumen. Damit limitiert es die Bioverfügbarkeit oral zugeführter Medikamente <sup>39,40</sup>.

Es ist immer noch nicht eindeutig geklärt auf welche Art und Weise Pgp seine Substrate aus den Zellen hinausbefördert. Es gibt zwei verschiedene mögliche Mechanismen, die im folgenden (Abb. 1-4, Abb. 1-5) auch graphisch dargestellt werden. Zum einen das reine Pumpenmodell: Substanzen dringen mittels passiver Diffusion in Zellen ein und werden durch Pgp, welches eine Pore formt, wieder hinaustransportiert. Die zweite Möglichkeit ist die des sogenannten Flippase-Modells: in diesem Modell interagiert eine Substanz erst mit Membranlipiden und wird dann durch Pgp vom inneren der Membran zum äußeren transportiert und von dort wieder in die Umgebung abgegeben <sup>41</sup>.

Durch das einzige Strukturmerkmal welches alle Pgp Substrate gemeinsam aufweisen, die Amphiphilie, ergibt sich, dass das Flippase Modell das wahrscheinlichere ist. Denn auf Grund der Amphiphilie sind alle Substanzen in der Lage mit der Membran zu interagieren.

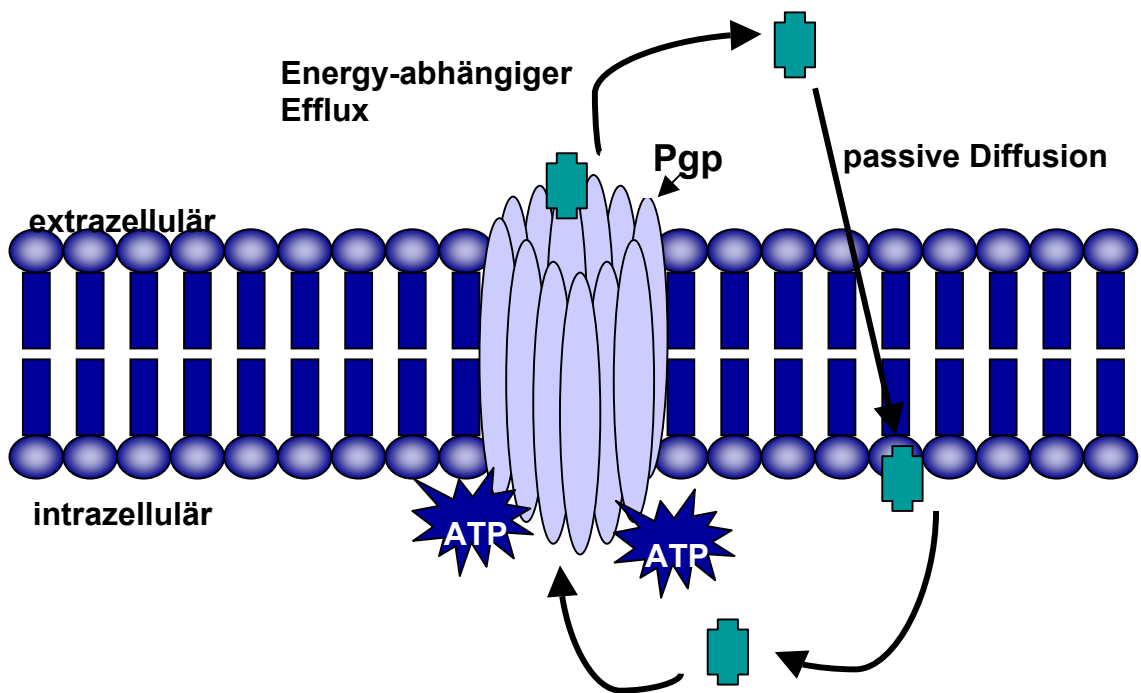


Abb. 1-4: Pumpmechanismus von P-Glykoprotein nach Borst P. 1999

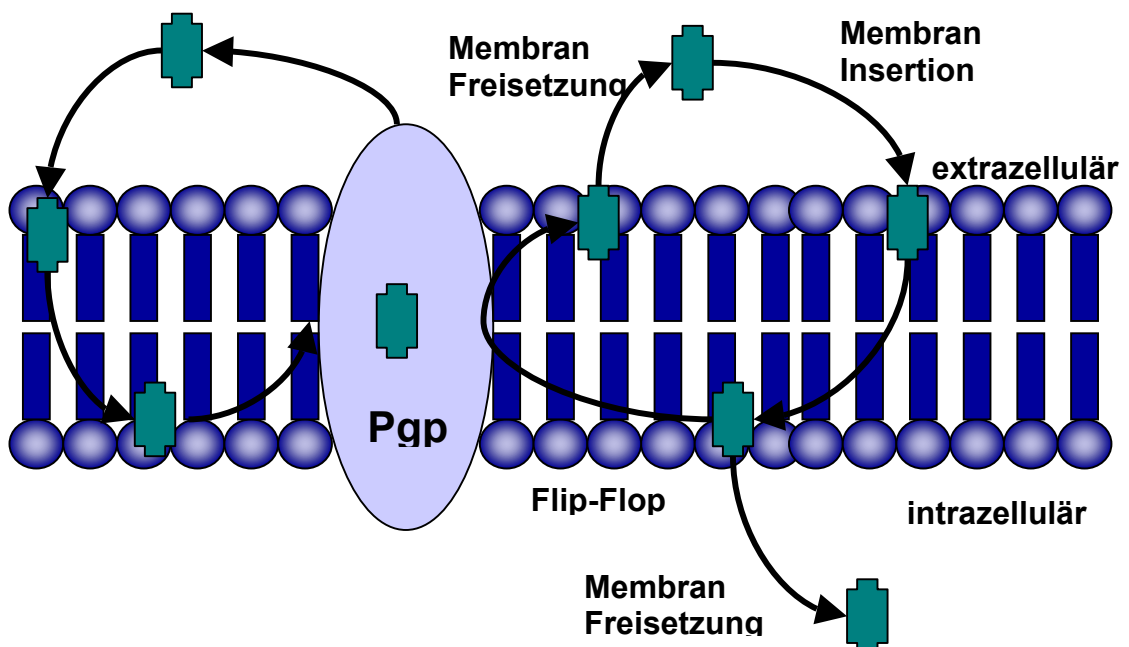


Abb. 1-5: Flippase-Mechanismus von P-Glykoprotein nach Borst P. 1999

Weitere Funktionen von Pgp wurden bis dato nicht gefunden. Zusammenfassend kann man sagen, dass Pgp als membranständiges, ATP-abhängiges Transportprotein eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Substanzen transportieren kann. Die Hauptfunktion scheint ein Schutz des Körpers bzw. wichtiger Strukturen des Körpers vor potentiell toxischen Substanzen zu sein. Im speziellen übt Pgp als wichtiger Bestandteil der BBB diese Schutzfunktion für das ZNS aus.

### 1.5.3 Modulation der Transportaktivität von P-Glykoprotein

Wie oben erwähnt, werden zahlreiche strukturell unterschiedliche Substanzen von Pgp transportiert und sind teilweise ebenfalls in der Lage mit der Transportaktivität von Pgp zu interagieren. Eine Modulation der Transportaktivität kann in verschiedenen Richtungen stattfinden und hat Auswirkungen auf die Pharmakokinetik parallel applizierter Substanzen. Der Transport kann verlangsamt bzw. gebremst werden, wenn die Funktion von Pgp inhibiert wird. Aber auch das Gegenteil ist möglich, eine Erhöhung der Transportfunktion. Dies ist auf zwei verschiedene Wegen möglich: zum einen über eine Aktivierung der Transportfunktion und zum anderen durch eine Erhöhung der Expression von Pgp. Durch eine Hemmung des Transports kommt es demnach zu erhöhten Bioverfügbarkeiten co-applizierter Substanzen. Eine Aktivierung oder Induktion bewirkt vermindert Plasmaspiegel von Komedikamenten. Es sind inzwischen zahlreiche solcher Wechselwirkungen bekannt und dokumentiert <sup>42-45</sup>.

Ein bekanntes Beispiel ist die Wechselwirkung von Digoxin und Cyclosporin A oder Chinidin. Bei gleichzeitiger Gabe kann es zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des Digoxin-Plasmaspiegels kommen <sup>46</sup>, was zu erheblichen Nebenwirkungen und im Einzelfall zu fatalen Intoxikationen führen kann <sup>47</sup>. Die Pharmakokinetik von Loperamid kann durch gleichzeitige Applikation von mit anderen Pgp interagierenden Stoffen verändert werden. Durch Hemmung von Pgp gelangt Loperamid dann ins ZNS und löst dort die für Opioide typischen Nebenwirkungen aus <sup>37,38</sup>.



Solche Wechselwirkungen können aber nicht nur zwischen zwei Arzneistoffen stattfinden. Auch Nahrungsmittel sind teilweise in der Lage mit Pgp zu interagieren und können daher unter Umständen die Pharmakokinetik von oral applizierten Pharmaka verändern. Das Trinken von Grapefruitsaft kann ebenfalls zu einer Inhibition von Pgp führen, da einige Inhaltsstoffe Pgp hemmen<sup>43</sup>. Dieses Prinzip hat man in der Therapie von HIV-Infektionen versucht auszunutzen. Proteaseinhibitoren sind nämlich ebenfalls Substrate von Pgp und ihre Bioverfügbarkeit wird demnach durch Pgp limitiert. Durch gleichzeitiges Trinken von Grapefruitsaft sollte Pgp inhibiert werden und die Plasmaspiegel der Proteaseinhibitoren erhöht werden. Das erwies sich allerdings als nicht sehr praktikabel, weil sehr große Mengen des Safts getrunken werden mussten. Im Arzneimittel Kaletra® wird das Prinzip aber doch ausgenutzt: Es enthält zwei verschiedene Proteaseinhibitoren, Ritonavir und Lopinavir. Ritonavir ist enthalten, weil es ein sehr potenter Inhibitor von Pgp ist. Plasmaspiegel und Hirngängigkeit von Lopinavir werden durch diese Hemmung erhöht und die Elimination wird verringert.

Ein Beispiel für eine Interaktion über eine Expressionsinduktion von Pgp wurde schon unter 1.5.2.2 gegeben und soll an dieser Stelle kurz wiederholt werden. Rifampicin ist nicht nur ein starker Induktor der Expression von Cytochromen, sondern induziert ebenfalls die Expression von Pgp. In gleicher Weise soll Johanniskrautextrakt wirken. Es kann durch beide Substanzen zu einer verminderten oralen Bioverfügbarkeit und somit zu subtherapeutischen und deshalb wirkungslosen Plasmakonzentrationen co-applizierter Arzneistoffe führen. Beide Substanzen wirken über den Pregnan-X-Rezeptor. Sie aktivieren diesen, wodurch es zu einer vermehrten Expression von sowohl metabolisierenden Enzymen wie den Cytochromen als auch Transportern wie Pgp kommt.

### **1.6 Membranständige Transporter und HPA-Achsen-Funktion**

Glucocorticoide können durch passive Diffusion Zellmembranen überwinden. Allerdings können sie auch über membranäre Steroid-Transporter wieder auswärts transportiert werden. Demnach sollen membranäre Steroid-Transporter die Funktion des GR und des MR über eine Modulation der Verfügbarkeit des intrazellulären Glucocorticoids regulieren <sup>14</sup>. Wird mehr Glucocorticoid mittels Transporter aus der Zelle sezerniert, steht weniger Ligand für den Rezeptor zur Verfügung und es kommt somit zu weniger rezeptorvermittelter Gentranskription.

Viele Studien konnten zeigen, dass bei depressiven Patienten der negative Feedback der HPA-Achse trotz erhöhter peripherer Cortisolkonzentrationen beeinträchtigt ist <sup>15</sup>. Das heißt, obwohl peripher hohe Konzentrationen von Cortisol zirkulieren, wird die weitere Ausschüttung nicht gehemmt. Studien zeigten, dass die Funktion des GR reduziert ist <sup>17</sup>. Zum Beispiel kommt es zu einer reduzierten Sensitivität bezüglich der Effekte der Glucocorticoide auf Immun- und metabolische Prozesse in Depressiven, obwohl die Zahl der Rezeptoren nicht herunterreguliert ist. Es deutet also alles darauf hin, dass die Funktion der Rezeptoren eingeschränkt ist und die Störung nicht auf eine verminderte Expression zurückzuführen ist.

In den letzten Jahren gibt es vermehrt Hinweise, dass Antidepressiva nicht nur über die Wiederaufnahmehemmung zahlreicher Neurotransmitter wirken sondern zusätzlich über eine Normalisierung der Aktivität der HPA-Achse. In zahlreichen Studien *in-vitro* und *in-vivo* konnte belegt werden, dass Antidepressiva unterschiedlicher Klassen direkt auf die Funktion des GR einwirken, diese verbessern und zusätzlich auch die Expression des Rezeptors erhöhen. Diese Studien belegen, dass eine erfolgreiche Antidepressiva-Therapie von einer Normalisierung der HPA-Achsen Funktion begleitet ist <sup>48</sup>. Dieser Effekt lässt sich nicht auf eine Klasse der Antidepressiva begrenzen sondern ist ein Phänomen, welches alle Klassen zeigen - unabhängig von Struktur und Wirkmechanismus.

Die meisten Studien mit tricyclischen Antidepressiva konnten zeigen, dass eine subchronische Behandlung mit diesen Substanzen zu einer Erhöhung der Expression von GR und MR im Gehirn führt. Diese Nachweise konnten sowohl in Patienten wie auch in Tierstudien erbracht werden. Selektive-Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) erhöhen hingegen subchronisch nur die Expression von MR <sup>48</sup>. Akute Behandlung mit diversen Antidepressiva hingegen führt zu einer Abnahme der Expression von GR und MR in Ratten <sup>49</sup>. Chronische Gabe von Antidepressiva scheint die Expression des GR wieder zu normalisieren, während die Expression des MR länger anhaltend erhöht ist <sup>48,49</sup>. Aber nicht nur die Erhöhung der Expression scheint wichtig zu sein, sondern zusätzlich eine Normalisierung der Funktion des Rezeptors an sich. Der Effekt kommt entweder durch einen obigen Mechanismen oder eine Kombination beider zustande. Mehrere Studien konnten belegen, dass bei Nagern eine Behandlung mit Antidepressiva zu einer Reduktion der basalen und Stress-induzierten HPA-Achsen Aktivität führt <sup>17</sup>. Hier ist die Erhöhung der Expression jedoch keine Bedingung für die Normalisierung der HPA-Funktion <sup>49</sup>. Es handelt sich um eine reine Funktions-Verbesserung des Rezeptors durch Antidepressiva-Gabe. Es ist also noch nicht abschließend geklärt, ob die Normalisierung der Funktion des Rezeptors oder aber die Erhöhung der Expression für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist. Zahlreiche zelluläre Studien haben versucht dieses Problem zu klären und es konnte gezeigt werden, dass Antidepressiva die GR-Translokation, die GR-Funktion und die GR-Expression regulieren <sup>17,21,48,50</sup>. Demnach ist eindeutig bewiesen, dass antidepressiv wirksame Substanzen nicht allein auf die Expression einen Einfluß haben, sondern auch eine direkte Wirkung auf die Funktion. Eine nähere Charakterisierung dieser Wirkung auf die Funktion konnte zeigen, dass die Wirkung auf den Rezeptor nicht mit der Wiederaufnahmehemmung von NA oder 5-HT korreliert. In den angewendeten zellulären Assays stehen die Systeme dafür gar nicht zur Verfügung. Diese Erkenntnisse werden durch Daten aus Tierstudien gestützt, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Reuptake-Hemmung der Neurotransmitter für die Änderung der Funktion und Expression des GR und MR nicht relevant ist <sup>48</sup>. Zusammenfassend kann man also sagen, dass es eine Hypothese gibt, die postuliert, dass der antidepressive Effekt auf die Funktion des GR durch direkte Wechselwirkung

mit dem Rezeptor zu Stande kommt und nicht indirekt über eine Neurotransmittererhöhung. Ob die Erhöhung der Expression ebenfalls zum Effekt beiträgt ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings ist diese Hypothese nicht für alle Klassen von Antidepressiva belegt.

Pariante et al. stellen die Hypothese auf, dass Antidepressiva durch eine Hemmung endogener membranständiger Steroid-Transporter wirken. Durch diese Hemmung wird die intrazelluläre Konzentration von Glucocorticoiden erhöht und somit die GR-vermittelte Genexpression gesteigert. Durch diese Erhöhung kommt es letztendlich zu einer normalisierten Feedback-Hemmung und dadurch zu einer Herrunterregulation der Funktion der HPA-Achse <sup>17</sup>. Diese Daten werden durch Ergebnisse, die an knockout Mäusen erhalten wurden, unterstützt. Die Abwesenheit von Pgp führt bei diesen knockout Mäusen zu einer verbesserten Penetration von endogenen Glucocorticoiden in das ZNS. Durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Glucocorticoiden kommt es zu einer verbesserten Feedback-Hemmung der HPA-Achse <sup>51</sup>. Pgp scheint also durch Kontrolle der Konzentration von Glucocorticoiden im ZNS eine entscheidende Rolle in der Modulation der HPA-Achsen Funktion zu spielen. Durch die Normalisierung der Funktion der HPA-Achse und damit durch die Absenkung der Cortisolkonzentration kommt es zu antidepressiven Effekten.

Diese Hypothese wird dadurch limitiert, dass gesichert sein muß, dass die Glucocorticoide durch Pgp transportiert werden. Laut publizierter Daten werden nur einige Glucocorticoide durch membranständige Transporter wieder aus der Zelle hinaus sezerniert. Diese Transporter gehören zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette Transporter). Von einem dieser Transporter, dem MDR Pgp, wurde beschrieben, dass er viele verschiedene, natürliche und synthetische Glucocorticoide transportiert. Zum Beispiel sezerniert Pgp Glucocorticoide aus der Nebenniere ins zirkulierende Blut <sup>52</sup> und an der BBB limitiert es den Eintritt von Dexamethason und Cortisol ins ZNS <sup>53,54</sup>. Es gibt allerdings unterschiedliche Auffassungen darüber, welche Glucocorticoide mittels Pgp transportiert werden. Schon 1990 zeigte die Arbeitsgruppe um Qian X., dass unter physiologischen Konditionen Progesteron durch Pgp aus Zellen transportiert wird <sup>55</sup>. Allerdings belegte eine andere Gruppe, dass Cortisol,

Aldosteron und Dexamethason durch MDR1 Pgp in transfizierten LLC-PK1 Zellen transportiert werden, Progesteron jedoch nicht <sup>52</sup>. Die Ergebnisse bezüglich Dexamethason werden von Schinkel et al. erhärtet, die ebenfalls an transfizierten LLC-PK1 Zellen zeigen konnten, dass Dexamethason sowohl durch MDR1 Pgp transportiert wird als auch durch mdr1a Pgp <sup>47</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe weist darauf hin, dass Progesteron nicht durch Pgp transportiert wird. Sie haben in SW620 Ad300 Zellen zeigen können, dass die Akkumulation von tritiiertem Progesteron in Zellen ohne Pgp nicht größer ist als in Zellen mit Pgp <sup>56</sup>. Farrell et al. kamen in Arbeiten an einer lymphozytären Zell-Linie zu dem Ergebnis, dass Cortisol durch MDR Pgp transportiert wird <sup>57</sup>. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine weitere Arbeitsgruppe, die den Efflux von radioaktivmarkiertem Cortisol aus Pgp exprimierenden Zellen beweisen konnte <sup>58</sup>. 2000 konnte die Gruppe um Karssen zeigen, dass Cortisol aber nicht Corticosteron durch menschliches und Nagetier Pgp aus Zellen heraus sezerniert wird. Sie zeigten zum einen, dass in mdr1a knockout Mäusen die Akkumulation von Cortisol größer ist als in Kontrolltieren, zum anderen, dass die Gegenwart von Pgp keinen Einfluß auf die Verteilung von Corticosteron hat. Desweiteren belegten sie an LLC-PK1 Zellen transfiziert mit menschlichem Pgp, dass Cortisol transportiert wird und Corticosteron nicht <sup>53</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Uhr et al. 2002, dass Cortisol, Corticosteron und Aldosteron durch MDR1-Pgps transportiert werden. Sie haben allerdings mdr1a/b knockout Mäuse für diese Versuche verwendet <sup>59</sup> und gezeigt, dass die Konzentration von diesen Glucocorticoiden im Gehirn der knockout Mäuse größer ist als in Kontrollen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Cortisol über mdr1a und/oder mdr1b Pgp transportiert wird, während Corticosteron nur über mdr1b Pgp transportiert wird. Eine weitere Arbeit teilt Glucocorticoide bezüglich ihres Transports und ihrer Modulation von Transportern in drei Gruppen ein. Die Glucocorticoide, welche sich in Gruppe 1 einordnen lassen, werden über MDR bzw. mdr Pgp transportiert. Hierzu gehört u.a. Dexamethason. Zu Gruppe 2 gehört u.a. Trimacrinolon Acetonit. Diese Glucocorticoide werden nicht über Pgp transportiert. In Gruppe 3 hingegen befinden sich die Glucocorticoide, welche durch MRP's transportiert werden. Dazu gehören Corticosteron und Desoxycorticosteron <sup>60</sup>. Es wurde also sowohl an zellulären Systemen als auch im Tiermodell untersucht, welche Glucocorticoide durch MDR1 und auch durch

mdr1a oder mdr1b Pgp transportiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten über den Transport von Glucocorticoiden durch Pgp kontrovers sind, es aber vermehrt Hinweise darauf gibt, dass Cortisol und auch Corticosteron durch Pgp transportiert werden.

Cortisol und Corticosteron scheinen die bei der Betrachtung der Depression wichtigen Glucocorticoide zu sein, denn es wurde vielfach beobachtet, dass bei depressiven Patienten der periphere Cortisolspiegel erhöht ist. Die Funktion, die Cortisol beim Menschen hat, hat Corticosteron im Nager. Hemmung von Pgp erhöht wie bereits beschrieben die intrazelluläre Konzentration von Glucocorticoiden, welche durch Pgp transportiert werden. Cortisol und Corticosteron werden laut Literatur mit großer Wahrscheinlichkeit beide über Pgp transportiert, die intrazelluläre Konzentration von beiden sollte also durch Hemmung von Pgp erhöht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige Glucocorticoide möglicherweise unter physiologischen Bedingungen durch Pgp transportiert werden, darunter Cortisol und Corticosteron. Antidepressiva sollen Pgp hemmen und somit zusätzlich zu ihren Neurotransmitter-modulierenden Effekten durch eine Erhöhung von intrazellulären Cortisolspiegeln wirken. Dadurch wird die in depressiven Patienten gestörte HPA-Achsen Funktion normalisiert und es kommt zu einer klinischen Verbesserung der Symptome. Die erhöhten intrazellulären Cortisolspiegel erlauben nämlich eine vermehrte Wechselwirkung mit GRs und somit kommt es zu einer verstärkten GR-vermittelten Gentranskription und verbesserten Feedbackhemmung. Zusätzlich erhöhen einige Antidepressiva die Expression von GRs. Das wirkt sich potenzierend auf den eben geschilderten Effekt aus.

## **1.7 In-vitro Zellsysteme**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene in-vitro Zellsysteme verwendet, um die modulatorischen Eigenschaften der unter 1.2 und 1.3 genannten Substanzen zu untersuchen. Zum einen Schweinehirnkapillar-Endothelzellen (PBCEC = porcine brain capillary endothelial cells) und zum anderen eine

Lymphoblastomzell-Linie CCRF-CEM (CEM) und deren multidrug resistente Variante CEM/VLB-100 (VLB). An beiden Systemen wurden die eventuellen inhibitorischen oder aktivierenden Eigenschaften der Antidepressiva und Antipsychotika untersucht. Die Langzeit-Effekte – nämlich eine mögliche Beeinflussung der Genexpression von Pgp – wurden an den Lymphoblastomzellen untersucht.

### **1.7.1 Schweinehirnkapillar-Endothelzellen**

Es handelt sich bei diesen Zellen um primär isolierte Kapillarendothelzellen aus Schweinehirnen. Diese Zellen exprimieren diverse Transporter der ABC-Familie, unter anderem Pgp<sup>61</sup>. Die PBCEC-Zellen dienen innerhalb dieser Arbeit als Modell für die Bluthirnschranke. Ihre Isolation und Kultivierung wird unter Material und Methoden beschrieben. Bei diesen Zellen handelt es sich um ein gängiges Modell für Untersuchungen an Pgp, welches oft in der Literatur beschrieben wurde<sup>62-64</sup>.

Da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen um Stoffe handelt, welche ihre Wirkung innerhalb des ZNS entfalten, war es ein Ziel der Arbeit zu testen, ob sie an der BBB Pgp in seiner Transportaktivität beeinflussen können. Zum einen vor dem Hintergrund, dass es zu Arzneimittelinteraktionen durch eine Hemmung/Aktivierung von Pgp kommen kann, zum anderen wie unter 1.6 genannt, weil sich die antidepressive Wirksamkeit möglicherweise über eine Interaktion mit Pgp erklären lässt<sup>65-67</sup>.

Da die Isolation dieser Zellen extrem aufwendig und teuer ist, wurden nicht alle Versuche auch an diesen Zellen durchgeführt. Die wichtigsten wurden jedoch alle auch an diesem Zellsystem ausgeführt.

### **1.7.2 Lymphoblastomzellen**

Bei den CEM Zellen handelt es sich um Zellen, die einem kaukasischen, knapp drei Jahre alten Mädchen mit einem Lymphoblastom entnommen wurden und anschließend kultiviert wurden<sup>68</sup>. Die Abkürzung CEM steht für den Namen des Mädchens. Diese Zellen zeichnen sich als Krebszellen durch unbegrenzte

Teilbarkeit aus. Sie wachsen in Suspension und sind einfach zu kultivieren. Diese Zellen exprimieren nur basale Mengen von Pgp.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Beck hat diese Zellen steigenden Mengen von Vinblastin ausgesetzt und somit eine resistente Sub-Zellart erhalten. Sie nahmen immer die unter einer bestimmten Menge Vinblastin überlebenden Zellen und gaben sie in Medium mit einer höheren Vinblastinkonzentration<sup>69</sup>. Eine Charakterisierung der Zellen, die gegen 100 ng/ml Vinblastin resistent waren, ergab veränderte Membraneigenschaften dieser Zellen. Die so resistent gewordenen Zellen sind nicht nur gegen Vinblastin, sondern auch gegen eine Vielzahl anderer Cytostatika resistent. Es handelt sich um sogenannte multidrug resistenten Zellen. Ein Phänomen, welches aus der cytostatischen Therapie wohl bekannt ist.

Die veränderten Membraneigenschaften dieser Zellen beruhen auf einer Überexpression eines auswärts-gerichteten Transporters, nämlich Pgp<sup>69</sup>. Die Zellen sind 269 mal so resistent gegen Vinblastin wie die CEM-Zellen. Da die Zellen aus einem kaukasischen Mädchen gewonnen wurden, handelt es sich hier um humanes Pgp.

Diese beiden Zellen CEM und VLB dienen in dieser Arbeit also als Untersuchungsmodell für das humane Pgp. Wenn man Substanzen an beiden Zellen untersucht, aber nur veränderte Eigenschaften innerhalb der VLB-Zellen detektieren kann, ist es sehr sicher, dass diese veränderten Eigenschaften auf der Expression von Pgp beruhen. Denn die Menge des exprimierten Pgp ist das einzige, welches CEM und VLB-Zellen unterscheidet.

An diesen Zellen wurden auf Grund der einfachen Handhabung und der Tatsache, dass es sich bei dem in diesen Zellen vorhandenen um das humane Pgp und nicht das Protein aus Schweinen handelt, wesentlich mehr Experimente durchgeführt als an den PBCEC-Zellen.



## **1.8 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Johanniskrautextrakt, dessen Hauptinhaltsstoffe und weitere Antidepressiva aus unterschiedlichen Klassen (Tricyclika, SSRI, SNRI) durch Hemmung der Transportaktivität von Pgp in der Lage sind, die Funktion der HPA-Achse zu normalisieren und somit antidepressiv zu wirken. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob durch diese Substanzen die Expression von Pgp beeinflusst wird. Als vergleichende Stoffe wurden zusätzlich einige Antipsychotika untersucht.

Da es Hinweise gibt, daß Antidepressiva wie Johanniskrautextrakt die Verteilung von Glucocorticoiden im Körper verändern und daher die Aktivität der HPA-Achse normalisieren, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung, ob Antidepressiva verschiedener Klassen die Verteilung von Cortisol im Menschen bzw. Corticosteron im Nager verändern können.

Die Modulation der Transportaktivität durch die zu untersuchenden Substanzen wurde in zwei Zell-Modellen in einem gängigen Transportassay (Calcein-AM) untersucht. Zum einen an Lymphoblastomzellen als Modell für das menschliche Pgp und zum anderen an Schweinehirnkapillarendothelzellen als Modell für die BBB.

Da Pgp ein energieabhängiger Transporter ist, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich eine Hemmung von Pgp indirekt durch eine Absenkung der intrazellulären ATP-Spiegel erklären lässt. Daher wurde mit den zu untersuchenden Substanzen ein Assay durchgeführt, welches die intrazellulären ATP-Spiegel nach Inkubation mit den jeweiligen Substanzen bestimmt.

Die Untersuchung, ob die Cortisol- bzw. Corticosteronverteilung nach Applikation von Antidepressiva verschiedener Klassen (Johanniskrautextrakt, Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin) verändert wird erfolgte *in-vivo* an Mäusen nach akuter und subchronischer Behandlung. Aus dem Gehirnhomogenat und

dem Plasma wurden die Corticosteronspiegel mittels EIA bestimmt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen.

Eine mögliche Veränderung der Expression von Pgp durch Johanniskrautextrakt und weitere Antidepressiva wurde *in-vitro* und *in-vivo* untersucht. Zum einen an Lymphoblastomzellen, zum anderen nach akuter und subchronischer Behandlung dieser Substanzen an Mäusen im Hirnhomogenat. Die Expression wurde dann mittels Western-Blot aus dem Ganz-Zell-Lysat und dem Maushirnhomogenat mit spezifischen Antikörpern gegen Pgp bestimmt.

Ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit wurde auf potentielle Arzneimittelinteraktionen durch Hemmung/Aktivierung von Pgp und/oder Erhöhung der Expression von Pgp gelegt.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Substanzen

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2-1:** in dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe

Substanz	Hersteller
[1,2,6,7- <sup>3</sup> H]Hydrocortison	Amersham Bioscience
Amphotericin B	Sigma
Anti Goat Zweitantikörper	Chemicon
Antikörper Pgp C-19	Santa Cruz Biotechnology
Antikörper Pgp C219	Alexis Biochemicals
Anti-Mouse Zweitantikörper	Chemicon
Calcein	Fluka
Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM)	Fluka
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Collagenase-Dispase	Roche
Complete mini	Roche
Dextran	Sigma
D-Glucose	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck
Dimethylsulfoxid	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dispase II	Roche
Dithiotreitol	Sigma
DMEM/Ham's F12	Biochrom
Dulbecco's PBS	PAA
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Bioscience
Ethanol	Merck
Fätales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Sigma
Gentamicin	Gibco
Glycerol	Gerbu

Harnstoff	Merck
HEPES	Merck
Hybond-P PVDF Transfermembrane	Amersham Bioscience
Ivermectin	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kollagen Typ I (Rattenschwanz)	Fluka
L-Glutamin	Bio Whittaker Europe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Medium 199	Biochrom
Medium 199 (10x)	Sigma
Methanol	Merck
Moxifloxacin	Bayer
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nupage MES SDS Running Buffer	Invitrogen
Nupage Transfer Buffer	Invitrogen
Penstrep	Bio Whittaker Europe
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco
Ponceau S Solution	Sigma
Probenecid	Sigma
RPMI 1640	PAA
Sample Buffer	Invitrogen
Tiamutin	Novartis
Trinatriumphosphat-Dodecahydrat	Merck
Triton-X-100	Merck
Trypanblau-Lösung	Biochrom
Trypsin (1:250), 0,25% in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA
Verapamil-HCl	Fluka
Vinblastin-sulfat	Fluka
Wasser	Aus Millipore-Anlage

### 2.1.2 Verwendete Kits

- LDH-Kit: Cytotoxicity Detection Kit von Roche
- ATP-Kit: ViaLight HT: high throughput cell proliferation/cytotoxicity Kit von Cambrex
- Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, Correlate EIA, Assay Designs von Biotrend

### 2.1.3 Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen

#### Zusätze zu Pufferlösungen und Kulturmedien (Stammlösungen)

Amphotericin B	1,25 mg/ml
Gentamicin	50,0 mg/ml
HEPES	1,0 M
L-Glutamin	200,0 mM
Penstrep	10.000 IE bzw 10.000 µg/ml

#### 2.1.3.1 Pufferlösungen

##### Cerebrospinalflüssigkeit, künstlich (kCSF), pH 7,4

NaCl	6,896 g	118,0 mM
KCl	0,224 g	3,0 mM
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O	0,266 g	0,7 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,512 g	18,0 mM
Harnstoff	0,120 g	2,0 mM
D-Glucose wasfr.	2,162 g	12,0 mM
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,154 g	0,8 mM
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,206g	1,4 mM
Wasser	ad 1000 ml	
Zusätze pro Flasche (500ml)	Penstrep	5,0 ml (100 IE bzw. 100 µg/ml)
	Gentamicin	1 ml (100,0 µg/ml)
	Amphotericin B	1 ml (2,5 µg/ml), 8 Units in der 1,0 ml Insulinspritze
	HEPES	5,0 ml (10,0 mM)

**Krebs-Ringer-Puffer (KRB), pH 7,4**

NaCl	8,3 g	142,0 mM
KCl	0,224 g	3,0 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	0,343 g	1,5 mM
HEPES	2,4 g	10,0 mM
D-Glucose, wasserf.	0,72 g	4,0 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,244 g	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,207 g	1,4 mM
Wasser	ad 1000 ml	

**Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salze, Ca<sup>2+</sup>-/Mg<sup>2+</sup>-frei, pH 7,4**

NaCl	8,00 g	137,0 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g	1,5 mM
Wasser	ad 1000 ml	

**Earles balanced salt solution (EBSS), Glucose-frei**

KCl	0,4 g/l
NaCl	6,8 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,158 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g/l

**Sten-Puffer**

Nonidet P-40	1,00 g	1%
Tris, pH 7.6	6,057 g	50,0 mM
NaCl	8,766 g	150,0 mM
EDTA	0,584 g	2,0 mM
Wasser	ad 1000 ml	

+ Protease Inhibitor PMSF und eine Tablette Complete Mini (Roche) auf 50ml

**TBST**

Tris-Base	2,42 g	20,0 mM
NaCl	8,00 g	1370, mM
Tween 20	0,50 ml	
konz HCl	ca. 1,3 ml (pH 7,4)	
Wasser	ad 1000 ml	

**2.1.3.2 Kulturmedien****Kulturmedium CEM/VLB-Zellen**

RPMI 1640	500 ml	
FCS	50 ml	9%
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml

**Einfriermedium CEM/VLB-Zellen**

Kulturmedium	40 ml	
DMSO	5 ml	10%
Glycerol	5 ml	10%

**Kulturmedium, serumhaltig, PBCEC**

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Pferdeserum	50 ml	9%

**Kulturmedium, serumfrei, PBCEC**

DMEM/Ham's F12	500 ml	
L-Glutamin	5 ml	2 mM
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM

**Einfriermedium PBCEC**

Kulturmedium	40 ml	
Pferdeserum	5 ml	gesamt 19%
DMSO	5 ml	10%

**Präparationsmedium, serumfrei, PBCEC**

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM

**Präparationsmedium, serumhaltig, PBCEC**

Präparationsmedium	500 ml	
Pferdeserum	50 ml	9%



### 2.1.4 Sonstige Lösungen

#### Calcein-AM-Stammlösung, 1 mM

Calcein-AM	5 mg	1 mM
DMSO	5 ml	

#### Dextranlösung 15%

Präparationsmedium	500 ml	
Dextran	77,5 g	15%

#### Percoll-Lösung 1,03 g/ml

Percoll	120 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Medium 199 (10x)	10 ml	
KRB	357 ml	

#### Percoll-Lösung 1,07 g/ml

Percoll	270 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
Penstrep	5 ml	100 IE bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Medium 199 (10x)	30 ml	
KRB	187 ml	

#### Triton-X-100-Lösung

Triton-X-100	1ml	2%
Wasser	ad 50 ml	

## **2.2 Untersuchte Substanzen**

### **2.2.1 Antidepressiva**

#### **2.2.1.1 Johanniskraut**

Johanniskrautextrakt LI 160	Lichtwer	Ch.-B. 02014982 Ch.-B. 02022680
Biapigenin	Schwabe	Ch.-B. SR04-105-D
OPC's aus Hypericum Extrakt	Schwabe	Ch.-B. DZ01-185-22
Amentoflavon	Schwabe	Ch.-B. SR04-068/C
Hyperforin-Na	Schwabe	Ch.-B. SON 066/7
Hypericin	Fluka	
Rutin	Sigma	
Quercetin	Sigma	
Hyperosid	Fluka	

#### **2.2.1.2 Charakterisierung der Extrakte**

Hypericum Trockenextrakt der Firma Lichtwer, LI 160, Ch. B.: 02 02 26 80

Naphtodianthrone: 0,24%

Gehalt Hyperforin: 3,77 %

Gesamtflavonoide: 5,92%

Hypericum Trockenextrakt der Firma Lichtwer, LI 160, Ch. B.: 02 01 4982

Naphtodianthrone: 0,28%

Gehalt Hyperforin: 2,29 %

Gesamtflavonoide: 7,37 %

**2.2.1.3 Tricyclische Antidepressiva**

Amitriptylin-HCl	Nattermann
Clomipramin-HCl	Sigma
Imipramin-HCl	Sigma
Nortriptylin-HCl	Sigma
Desipramin-HCl	Sigma
Opipramol	Novartis

**2.2.1.4 Tetracyclische Antidepressiva**

Mirtazapin	Stada
------------	-------

**2.2.1.5 SSRI**

Fluoxetin-HCl	Tocris
Citalopram	Lundbeck

**2.2.1.6 SNRI**

Reboxetinmaleat	Pharmacia Upjohn
-----------------	------------------

**2.2.2 Neuroleptika**

Haloperidol	RBI
Clozapin	Sandoz AG
Chlorpromazin-HCl	Sigma

**2.2.3 Corticoide**

Cortisol	Sigma
Progesteron	Sigma
Corticosteron	Sigma

### **2.2.4 Lösungsmittel**

Alle Salze wurden in Wasser (bidestilliert und autoklaviert) gelöst. Die übrigen Substanzen wurden in DMSO, Ethanol (abs. oder 60%) oder Methanol gelöst. Das Lösungsmittel wurde nach Angabe der Firma bzw. nach Löslichkeitsprodukt gewählt. Es wurde stets mit getestet, ob das Lösungsmittel einen Effekt auf den jeweiligen Versuch hat. Es wurden konzentrierte Stammlösungen der zu untersuchenden Substanzen hergestellt, die an jedem Versuchstag zu den entsprechenden zu testenden Konzentrationen mit Medium oder Puffer verdünnt wurden.

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Einmalpipetten 5/10/25 ml	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
96-well-Platten Rundboden, steril	Greiner, Frickenhausen
96-well-Platten, Flachboden, steril	Greiner, Frickenhausen
96-well-Platten, Flachboden, unsteril	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen 15/50 ml	Greiner, Frickenhausen
Eppendorfcups 1,5 ml und 2,2 ml	Greiner, Frickenhausa
Combitips	Eppendorf
Falcon-Röhrchen 15/50 ml	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen

## **2.4 Zellkultur**

### **2.4.1 Vorarbeiten für die Zellkultur**

Zur Herstellung der Kulturmedien wurden stets sterile Fertigmedien und sterile Zusätze verwendet. Sonstige Lösungen, wie zum Beispiel Pufferlösungen, wurden mit autoklaviertem Millipore-Wasser hergestellt. Nicht-sterile Verbrauchsmaterialien wurden durch Autoklavieren (20 min 121°C, 2 bar) sterilisiert. Die Arbeitsschritte, die aseptisch ausgeführt werden mussten, wurden unter einer Laminar-Flow-Werkbank nach Desinfektion der Arbeitsfläche mit Bacillol durchgeführt. Die Brutschränke wurden einmal im Monat mit Bacillol gereinigt, das Wasser gewechselt und ausbaubare Teile wurden autoklaviert. Ebenso wurde die LF-Bank einmal im Monat gereinigt.

### **2.4.2 Isolierung von PBCEC**

Die zur Isolierung von PBCEC benötigten Schweinehirne wurden am Tag der Präparation vom Schlachthof in Aschaffenburg geholt. Geschlachtet wurden männliche und weibliche Tiere der Rassen Deutsches Edelschwein und Piétrainschwein. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels Elektrobetäubung. Getötete Tiere wurden mit 62°C heißem Wasser gewaschen und mit einer Kratzmaschine entborstet. Nach dem Entfernen der Eingeweide wurden die Tiere der Länge nach mit einer Kettensäge halbiert. Die Hirnhälften wurden dann von der Autorin aus dem Schädel entfernt, so dass eine Vorauswahl des Materials nach Zustand des Gewebes getroffen werden konnte. Es wurden ca 25 Hälften entnommen, sofort in künstliche Cerebrospinalflüssigkeit gegeben und bis zur Präparation auf Eis gelagert. Vom Zeitpunkt der Tötung der Tiere bis zur Entnahme der Hirnhälften vergingen im Schnitt 10 min, von der Tötung der Tiere bis zur Präparation durchschnittlich 90 min.

Für die Isolierung der PBCEC wurden 20 Hirnhälften von je ca. 50 g, also insgesamt ca. 1000 g Hirnmaterial, verwendet. Zuerst wurden die Hirnhäute, die versorgenden Blutgefäße und der Choroid-Plexus, gegebenenfalls noch das Kleinhirn und das verlängerte Rückenmark, mit einer Pinzette und Skalpellen entfernt. Die auf diese Art und Weise gereinigten Hirnhälften wurden mit kaltem kCSF gewaschen und noch zweimal auf Hirnhautüberreste, Blutgefäße und andere Verunreinigungen kontrolliert. Anschließend wurde die graue kortikale Substanz mit einem Skalpell vom Großhirn abgeschabt. Diese Substanz wurde dann zerkleinert, in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben gesammelt und mit 100 ml 4°C kaltem Präparationsmedium versetzt. Nachdem von allen Gehirnen die Substanz gesammelt war, wurde das Volumen auf 700 ml mit 37°C warmen Präparationsmedium aufgefüllt und mit, in 50 ml Präparationsmedium gelöster und auf 37°C vorgewärmter, Dispase versetzt (Dispase Endkonzentration 5 mg/ml bzw. 0,5% (m/V)). Im Anschluß wurde der pH-Wert mit 2N NaOH unter Rühren auf 7,4 eingestellt. Es wurde dann 2h unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C inkubiert und nach einer Stunde der pH-Wert nochmals eingestellt.

Am Ende der Inkubation wurde der Ansatz auf vier Zentrifugenbecher verteilt. Nach anschließender Zentrifugation (1000 x g, 10 min, Sorvall RC 5C Plus) wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Hirngewebe wurde mit 15%iger Dextranlösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (5800 x g, 10 min, Sorvall RC 5C Plus). Durch die Dextrandichtezentrifugation wurde das Hirngewebe in Gehirnkapillaren, Erythrozyten und Zelltrümmer sowie lipophiles Zellmaterial aufgetrennt. Das aufschwimmende lipophile Zellmaterial wurde zusammen mit der Dextranlösung abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden in insgesamt 25 ml Präparationsmedium (37°C) resuspendiert und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben vereinigt. Nach Zugabe von 30 mg Collagenase/Dispase, gelöst in 5 ml Präparationsmedium und vorgewärmt auf 37°C, wurde erneut 90 min unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C inkubiert (Collagenase/Dispase Endkonzentration 1 mg/ml bzw 0,1% (m/V)).

Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 150 µm Polyester Siebgewebe filtriert und mit 4°C kaltem serumhaltigem Präparationsmedium zu 100 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (130 x g, 4°C, Beckmann Allegra 6R). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in jeweils 4 ml serumhaltigem Präparationsmedium aufgenommen und vereinigt. Jeweils ein Milliliter der Zellsuspension wurde auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten aus 15 ml Unterphase (Dichte 1,07 g/ml) und 20 ml Oberphase (Dichte 1,03 g/ml) vorsichtig aufgetragen. Durch anschließende Percoll-Dichtezentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C, Beckmann Allegra 6R) wurden die Endothelzellen von den Zelltrümmern und den Erythrozyten abgetrennt. Die Zelltrümmer befanden sich als flotierende Bande auf der Oberphase, während die Erythrozyten als Pellet in der Unterphase zu finden waren. Die Gerhinkapillarendothelzellen befanden sich in der Interphase zwischen den beiden Percoll-Lösungen und wurden durch vorsichtiges Absaugen mit einer Pasteurpipette isoliert. Die einzelnen Endothelzellfraktionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit kaltem serumhaltigen Präparationsmedium zu 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (130 x g, 10 min, 4°C, Beckmann Allegra 6R). Die Pellets wurden anschließend in 4°C kaltem serumhaltigem Präparationsmedium resuspendiert, vereinigt und erneut durch ein Siebgewebe (150 µm Polyester) filtriert. Abermals wurde mit 4°C kaltem serumhaltigem Präparationsmedium gewaschen und zentrifugiert (130 x g, 10 min, 4°C, Beckmann Allegra 6R). Die Zellen wurden in 4 ml Einfriermedium ohne DMSO aufgenommen und mittels Trypanblau-Ausschlußtest in einer Neubauer-Zählkammer im Verhältnis 1:10 Zellsuspension : Trypanblaulösung gezählt. Die isolierten PBCEC wurden dann auf 5 Mio Zellen/ml mit Einfriermedium eingestellt, die entsprechende Menge DMSO wurde zugegeben und jeweils 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Im Gefrierschrank (-80°C) wurde dann mit einer Abkühlungsrate von 1°C/min kontrolliert eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgesetzt.



### 2.4.3 Kultivierung der PBCEC

Grundbedingung für Wachstum und Differenzierung von Zellen in Kultur ist eine stete Versorgung mit frischem Nährmedium. Hierdurch werden einerseits frische Nährstoffe bereitgestellt, andererseits werden in das Medium abgegebene z. T. toxische Stoffwechselprodukte entfernt. Zu häufiger Mediumwechsel kann eine mechanische Belastung für die empfindlichen Kapillarendothelzellen darstellen. In dieser Arbeit wurde sich an den Ergebnissen zur optimalen Kultivierung dieser Zellen der Arbeitsgruppe von Prof. Fricker in Heidelberg orientiert.

Die Zellkulturflaschen, in denen die Kapillarendothelzellen ausgesäht werden sollten, wurden mit Rattenschwanzkollagen vorbeschichtet. Es wurden 10 ml einer Kollagenlösung in die Flaschen gegeben, so dass die Endkonzentration  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  betrug. Die Flaschen wurden dann 4h im Brutschrank gelagert. Nach 4h wurde Kollagen-Lösung abgesaugt und die Flaschen wurden zum Trocknen 15 min offen unter der Laminarflow-Bank gelagert.

Drei Kryoröhrchen, also insgesamt 15 Mio Zellen, wurden im Wasserbad aufgetaut. Um eine Schädigung der Zellen durch das im Einfriermedium vorhandene DMSO zu vermeiden, wurde die Zellsuspension sofort nach Auftauen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 30 ml Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden abzentrifugiert ( $130 \times g$ , 10 min, Beckmann Allegra 6R), mit 1 ml Medium resuspendiert und in die Kulturflasche, in der 30 ml Medium vorgelegt waren, gegeben.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 30 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben.

Um eventuelle Verunreinigungen der Zellen durch Kapillarfragmente und Fremdzellen zu vermeiden wurden die Zellen am 4. Kulturtag passagiert. Bei der während des Passagierens stattfindenden Trypsinisierung lösten sich nur Endothelzellen von der Kulturfläche. Nach der Passage war die Zellkultur weitgehend frei von Verunreinigungen. Passagierte Endothelzellen können bei gleicher Aussaatdichte besser an der Kulturfläche haften als nicht-passagierte.

Aus diesem Grund wurden zwei 96-well Flachboden-Platten mit Kollagen-Lösung ( $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) für 4h vorbeschichtet. Nach 4h wurde die Kollagen-Lösung abgesaugt und die Platten zum Trocknen für 15 min offen unter der Laminarflow-Bank stehen gelassen. Das Medium in der Kulturflasche wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit jeweils 10ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und dann mit 5 ml Trysinlösung versetzt. Nach 5 min wurden 5 ml Pferdeserum zur Inaktivierung hinzugegeben. Die Zellen wurden dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Flasche zweimal mit jeweils 10 ml Medium nachgespült. Nach Abzentrifugieren ( $130 \times g$ , 10 min, Beckmann Allegra 6R) wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium aufgenommen.  $10\mu\text{l}$  davon wurden 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde dann auf 400.000 Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellt. Jeweils  $100 \mu\text{l}$  wurden anschließend in jedes well der 96-well- Platte gegeben.

Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch  $100 \mu\text{l}$  neues Kulturmedium ersetzt.

Am 7. Tag fand ein erneuter Mediumwechsel statt. Das Kulturmedium wurde wiederum abgesaugt und jeweils  $100 \mu\text{l}$  serumfreies Kulturmedium hinzugefügt und am Tag 8 wurde dann der jeweilige Versuch durchgeführt.

#### Übersicht:

<b>Tag 1</b>	Aussähen in Kulturflasche mit serumhaltigem Kulturmedium
<b>Tag 2</b>	Mediumwechsel mit serumhaltigem Kulturmedium
<b>Tag3</b>	-
<b>Tag 4</b>	Passage; Aussähen 96-well-Platte mit serumhaltigem Kulturmedium
<b>Tag 5</b>	Mediumwechsel mit serumhaltigem Kulturmedium
<b>Tag 6</b>	-
<b>Tag 7</b>	Mediumwechsel mit serumfreiem Kulturmedium
<b>Tag 8</b>	Versuch

#### **2.4.4 Kultivierung der CEM und VLB-Zellen**

Auch für die Lymphoblastomzellen ist eine stete Versorgung mit frischem Nährmedium essentiell. Die CEM- und VLB-Zellen werden dauerhaft in RPMI 1640 Medium kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell, um Schäden durch das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu vermeiden, in 30 ml Medium gegeben und abzentrifugiert (130 x g, 10 min, Beckmann Allegra 6R). Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche pipettiert, die 20 ml Medium enthielt. Alle 3-4 Tage wurde das Medium abzentrifugiert, die Zellen mit PBS gewaschen und dann erneut ausgesäht. Um große Mengen Zellen zu erhalten wurden große Kulturschalen mit 40 ml Medium verwendet.

### **2.5 Calcein-AM-Assay**

#### **2.5.1 Das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem**

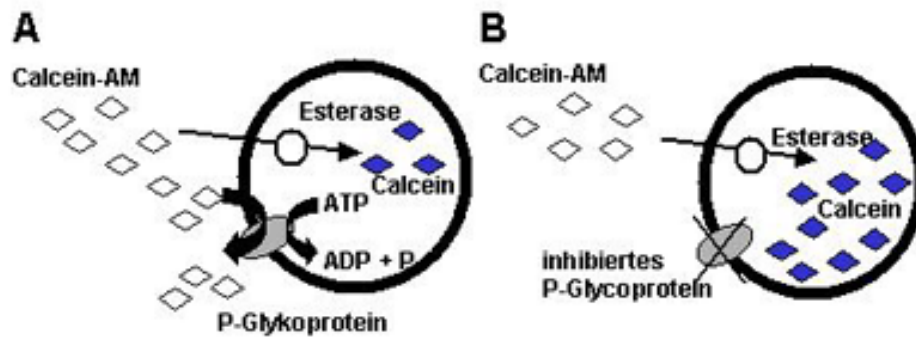
Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist ein nicht fluoreszierender lipophiler Ester mit einem Molekulargewicht von 994,9 g/mol. Die dissoziierte Säure Calcein ist ein stark fluoreszierendes hydrophiles Molekül mit einem Molekulargewicht von 622,5 g/mol. Die Calcein-Fluoreszenz ist unabhängig vom pH-Wert, von der Calcium- und Magnesium-Konzentration und weist keinen Quenching-Effekt auf. Calcein bindet nicht an intrazelluläre Bestandteile und wird nicht in Zellkompartimenten angereichert [www.probes.com/handbook/Kapitel15.5].

Das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem hat sich in zahlreichen Untersuchungen an P-Glykoprotein überexprimierenden Zellen bewährt<sup>63,70,71</sup> und wurde bereits erfolgreich in der Klinik zur Vorhersage von Therapie-Respondern und der Überlebensrate bei der Behandlung von akuter myelotischer Leukämie eingesetzt<sup>72</sup>.

Calcein-AM permeiert leicht mittels passiver Diffusion durch die Zellmembran und gelangt so rasch ins Zellinnere. Die schnelle Verteilung über die Lipid-Doppelschicht führt dabei zu einem Gleichgewicht zwischen extra- und

intrazellulärer Calcein-AM-Konzentration. Im Inneren der Zelle wird Calcein-AM sofort durch unspezifische Esterasen ATP-unabhängig mit einem hohen turnover von etwa  $3 \times 10^6/\text{min}$  irreversibel zu dem stark fluoreszierenden Calcein hydrolysiert (Abb. 2-1). Daher ist Calcein-AM intrazellulär quasi nicht existent, sondern liegt nur in der Form der dissoziierten Säure Calcein vor. Hydrophiles Calcein kann nicht durch die Zellmembran permeieren und wird nicht durch Pgp aus Zellen hinaus transportiert, daher wird es in der Zelle zurückgehalten (bei  $37^\circ\text{C}$  liegt die Halbwertszeit der Calcein-Diffusion aus der Zelle bei  $>3\text{h}$ ). Calcein-AM jedoch ist ein sehr gutes Substrat von Pgp und wird mittels dieses Transports aktiv aus der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran transportiert. Dadurch wird es an der Permeation in die Zelle gehindert.

Wenn nun eine Testsubstanz mit Pgp - entweder kompetitiv als Substrat oder nicht-kompetitiv als Inhibitor - interagiert, gelangt mehr Calcein-AM in die Zelle, welches dann zu Calcein gespalten werden kann und damit die intrazelluläre Fluoreszenz erhöht (Abb. 2-1). Dabei ist die intrazelluläre Calcein-Fluoreszenz proportional zur Intensität der Interaktion zwischen Testsubstanz und Pgp, so dass eine schwache Interaktion zu einem geringen Fluoreszenzanstieg führt und eine starke Interaktion einen starken Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz bewirkt <sup>71</sup>. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt gegen unbehandelte Zellen als Kontrolle. Die Interaktion zwischen Testsubstanz und Pgp wird als prozentualer Effekt der Testsubstanz bezogen auf die Kontrolle angegeben.



**Abb. 2-1 Das Calcein-AM Indikatorsystem**

*A: nicht-fluoreszierendes Calcein-AM diffundiert leicht durch die Zellmembran und wird im Inneren der Zelle durch unspezifische Esterasen zum fluoreszierenden Calcein gespalten. Teile werden direkt in der Membran abgefangen und durch Pgp wieder hinaus transportiert. B: Wenn Pgp gehemmt ist, wird mehr Calcein-AM aufgenommen und gespalten. Es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz.*

## 2.5.2 Messung an PBCEC-Zellen

In der Etablierungsphase dieses Assays wurde auf Vorversuche zur Zellzahl verzichtet, da man sich an den Ergebnissen zum Einflussfaktor Aussaatdichte der Arbeitsgruppe Fricker orientieren konnte. Die Aussaatdichte wirkt sich aus auf das Wachstumsverhalten von Endothelzellen, sowie auf die Dichtigkeit der Monolayer und in Fluoreszenzversuchen natürlich auch auf die Stärke des Fluoreszenzsignals. Für das Calcein-AM-Assay wurden jeweils 40.000 Zellen/well eingesetzt.

Die zu testenden Substanzen werden an jedem Versuchstag aus eingefrorenen Stammlösungen neu verdünnt. Die Verdünnungsreihe wird mit KRB hergestellt.

Die 7 Tage lang kultivierten PBCEC werden einmal mit 37°C warmer KRB-Lösung gewaschen und dann mit 100 µl KRB versetzt. Anschließend werden die zu testenden Substanzen bzw. Puffer oder Verapamil als Kontrollsubstanz zugegeben und 15 min bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert. Danach wird die Calcein-AM-Lösung hinzugegeben und es wird weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen dreimal mit eiskalter KRB-Lösung gewaschen und im Anschluß mit Triton-X-100-Lösung (2%) lysiert. Die

fertig lysierten Zellen werden im Fluoreszenzplattenlesegerät (Wallac Victor<sup>R</sup>, 1420 Multilabel Counter) vermessen.

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 4 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

**Kontrollen:**

An jedem Versuchstag wurden unbehandelte Zellen mit vermessen, d.h. Zellen, die nicht mit Modulator sondern nur mit KRB behandelt sind.

Des Weiteren wird jeden Tag eine Positivkontrolle mit Verapamil vermessen. Anstelle der zu testenden Substanz werden die Zellen mit Verapamil (50µM) vorinkubiert.

Um eine Interaktion über MRP2 auszuschließen, wurde der spezifische MRP2-Inhibitor Probenecid (1mM) eingesetzt.

Um Quenching-Effekte auszuschließen wurden alle Substanzen ohne Zellen mit Calcein inkubiert. Eine direkte Interaktion zwischen der Substanz und dem intrazellulär entstehenden Calcein konnte so gezeigt bzw. ausgeschlossen werden.

**2.5.3 Messung an CEM und VLB Zellen**

Die zu testenden Substanzen werden an jedem Versuchstag aus eingefrorenen Stammlösungen neu verdünnt. Die Verdünnungsreihe wird mit Kulturmedium hergestellt.

Die CEM und VLB Zellen werden einmal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend werden sie in einer definierten Menge Medium aufgenommen, 10 µl davon mit 90 µl Trypanblau- Lösung verdünnt und gezählt. Beide Zell-Linien werden auf 5 Mio Zellen/ml Medium eingestellt und jeweils 100µl in 96 well-Platten pipettiert.

Es werden dann die zu testenden Substanzen bzw. Verapamil zugegeben und 15 min bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert. Danach wird die Calcein-AM-Lösung hinzugegeben und weitere 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Inkubation werden die 96 well Platten für 5 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (150 x g, 8 min, Beckmann Allegra 6R). Der Überstand wird verworfen und die Zellen mit eiskaltem Medium resuspendiert und gewaschen. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt und dann werden die Zellen in eine 96 well Platte mit glattem Boden überführt. Diese Zellen werden nicht lysiert. Die Lyse ist laut Datenlage an diesen Zellen nicht notwendig <sup>73</sup>. Nach Zugabe von jeweils 100µl Medium pro well wird die Platte mit dem Fluoreszenzplattenreader (Wallac Victor<sup>R</sup>, 1420 Multilabel Counter) vermessen.

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 4 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

**Kontrollen:**

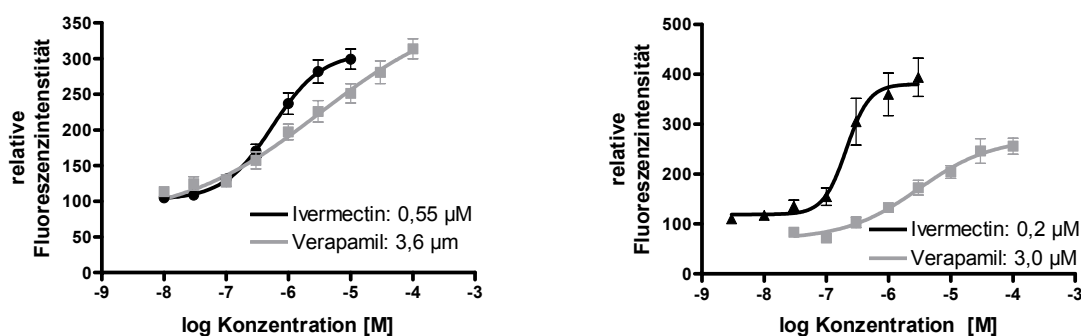
An jedem Versuchstag werden unbehandelte Zellen mit vermessen, d.h. Zellen, die nicht mit Modulator sondern nur mit Medium behandelt sind.

Als Positivkontrolle dient jeden Tag eine Kontrolle mit Verapamil. Anstelle der zu testenden Substanz werden die Zellen mit Verapamil (50µM) vorinkubiert.

Um eine Interaktion über MRP2 auszuschließen, wurde der spezifische MRP2-Inhibitor Probenecid (1mM) eingesetzt.

### 2.5.4 Methodenvalidierung

Zur Validierung dieses Assays wurden mit den CEM- und VLB-Zellen die Abhängigkeit von der Zellzahl sowie die Inkubationszeitabhängigkeit bestimmt. Die Ergebnisse sollen hier jedoch nicht dargestellt werden. Des Weiteren wurden Experimente mit zwei gängigen P-Glykoprotein-Inhibitoren durchgeführt und deren EC<sub>50</sub> Werte an beiden Zellsystemen bestimmt. Ivermectin ist in der Literatur als starker und Verapamil als mäßiger Inhibitor von P-Glykoprotein beschrieben. Die erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte sind in Abb. 2-2 dargestellt und wurden mit Literaturdaten verglichen<sup>74,75</sup>. Da sehr gute Übereinstimmungen erzielt worden waren, wurden keine weiteren Substanzen getestet. Auf Grund dieser guten Übereinstimmung wurde das Assay an beiden Zellsystemen genauso übernommen.



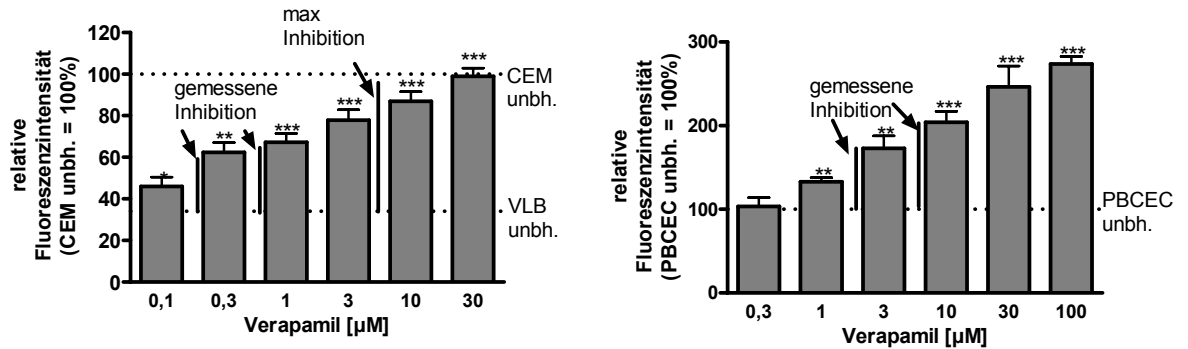
**Abb. 2-2: EC-50 Bestimmung von Ivermectin und Verapamil**

(A) VLB-Zellen und (B) PBCEC-Zellen; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 6-8$ ; Literatur Verapamil: 18,9 µM (L-MDR cells), 2,0 µM (PBCEC cells); Ivermectin: 9 µM (Caco-2VCR25 cells)<sup>74,75</sup>

### 2.5.5 Darstellung der Ergebnisse

Die Daten werden nicht als absolute Fluoreszenzeinheiten dargestellt, sondern als Prozentwerte. Bei den PBCEC-Zellen wird die unbehandelte Kontrolle jeweils als 100% gesetzt. Bei den Lymphoblastomzellen werden unbehandelte CEM-Zellen als 100% gesetzt und die VLB-Zellen (behandelt und unbehandelt) darauf bezogen. Die erhaltenen Werte werden dann als Prozent der maximal zu erzielenden Inhibition angegeben (Abb. 2-3).





**Abb. 2-3: Darstellung der Ergebnisse des Calcein-Assays**

Beispiel Verapamil an beiden Zellsystemen. Links VLB und CEM-Zellen, rechts PBCEC-Zellen; Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$

Bei den Lymphoblastomzellen wird der Unterschied zwischen unbehandelten VLB- und unbehandelten CEM-Zellen als maximale Inhibition definiert. Als gemessene Inhibition wird der Unterschied von behandelten und unbehandelten VLB-Zellen erklärt. Graphisch aufgetragen wird dann der Prozentsatz der gemessenen an der maximalen Inhibition.

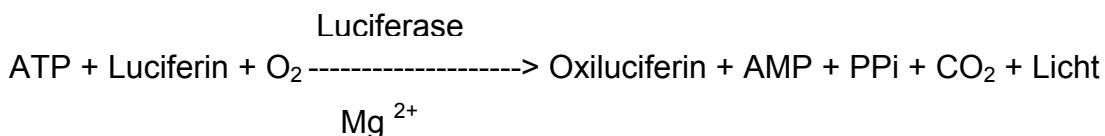
$$\% \text{ max Inhibition} = \text{gemessene Inhibition} * 100 / \text{maximale Inhibition}$$

Bei den PBCEC-Zellen wird die gemessene Fluoreszenz von unbehandelten Zellen wie oben genannt als 100% definiert. Die gemessene Inhibition ergibt sich als die Inhibition von behandelten Zellen minus der von unbehandelten Zellen (100%).

$$\% \text{ Inhibition} = \text{Inhibition behandelter Zellen} - 100\%$$

## 2.6 ATP-Assay

Um eine indirekte Hemmung von Pgp durch Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels auszuschließen, wurden Substanzen, die sich im Calcein-AM Assay als interessant erwiesen haben, mittels des ViaLight HT Kits dahingehend untersucht, ob sie in der Lage sind intrazelluläre ATP-Spiegel zu senken. Das Assay beruht auf folgender Reaktion:



Das entstehende Licht wird mittels eines Lumineszenzmeßgerätes (Wallac Victor<sup>R</sup> 1420 Multilabel Counter) vermessen. Die Lichtmenge ist proportional zur ATP-Konzentration. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird als Positivkontrolle mitvermessen, weil es über Hemmung der Atmungskette die intrazelluläre ATP-Konzentration erwiesenermaßen absenkt. Die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhaltenen Validierungsdaten sind unter 3.2.5 dargestellt.

### 2.6.1 Messung an PBCEC-Zellen

Auch an diesem Zellsystem erfolgte die Etablierung des Assays anhand der Herstellerangaben in der Kitbschreibung. Mit der schon im Calcein-AM-Assay eingesetzten Zellzahl konnten auch in diesem Assay gute und reproduzierbare Werte erzielt werden. Die Zellen werden vor dem Versuch einmal mit KRB-Puffer gewaschen und dann mit 100 µl KRB versetzt. Die zu untersuchenden Substanzen werden hinzugegeben und 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wird die 96-well Platte auf RT abgekühlt. Der ATP-Standard wird dann als Positivkontrolle hinzu pipettiert und anschließend werden alle wells mit der Mischung aus ATP-monitoring Reagenz und Nukleotid-releasing Reagenz versehen. Die Platte wird sofort mit dem Lumineszenz-Plattenreader vermessen (innerhalb von 10 min).

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 2 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

**Kontrollen:**

Positivkontrolle: ATP-Standard 100µM. Als Kontrolle für die Reproduzierbarkeit des Assays wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM) in jedem Versuch mit vermessen.

**2.6.2 Messung an CEM und VLB-Zellen**

Bei der Etablierung des Assays wurde in Vorversuchen die optimale einzusetzende Zellzahl ermittelt. Zellzahlen >10.000 Zellen/well erwiesen sich als zu hoch. Von daher wurde die Dichte 10.000 Zellen/well für dieses Assay gewählt. Ansonsten wurde die Etablierung auf Basis der Angaben des Herstellers in der Kitbeschreibung durchgeführt.

Die Zellen werden mit PBS Puffer einmal gewaschen und dann auf 100.000 Zellen/ml Medium eingestellt. Davon werden 100 µl in jedes well einer weißen 96 well Platte pipettiert. Die zu untersuchenden Substanzen werden hinzugegeben und 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte auf RT abgekühlt. Als Positivkontrolle wird danach in 3 wells ATP Standard pipettiert und anschließend alle wells mit einer Mischung aus ATP-monitoring Reagenz und Nukleotid-releasing Reagenz versehen. Die Platte wird sofort mit dem Lumineszenz-Plattenreader (innerhalb von 10 min) vermessen.

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 2 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

**Kontrollen:**

Positivkontrolle: ATP-Standard 100µM. Als Kontrolle für die Reproduzierbarkeit des Assays wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM) in jedem Versuch mit vermessen.

## 2.7 LDH-Assay

Da bei einigen Substanzen ein Abfall der Calcein-Fluoreszenz zu beobachten war, musste geklärt werden, ob diese Beobachtung sich dadurch erklären lässt, dass die jeweilige Substanz zelltoxische Effekte hat. Durch ein vermehrtes Zell-Sterben verbleibt weniger Calcein innerhalb der Zelle und dies würde – neben einer Aktivierung von Pgp – ebenfalls den Abfall der intrazellulären Fluoreszenz erklären.

Das verwendete Kit beruht auf der Messung des Gehaltes an Lactatdehydrogenase (LDH), einem zytoplasmatischen Enzym, das im Fall von einer Zellwandschädigung aus intakten Zellen austritt. Der Gehalt des mittels Farbreaktion detektierten Enzyms aus dem Zellüberstand korreliert mit der Anzahl der lysierten und damit abgestorbenen Zellen. LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen präsent ist. Es wird bei einer Schädigung der Zellmembran schnell in das umgebende Medium abgegeben und kann damit aus dem Überstand einfach bestimmt werden.

Die Farbreaktion beruht auf der Umsetzung eines gelben Tetrazoliumsalzes zu einem roten Formazansalz. Im ersten Reaktionsschritt reduziert die ins Medium freigesetzte LDH  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Diese zwei H's werden dann im zweiten Schritt auf das Tetrazoliumsalz übertragen, welches damit zum roten Formazansalz wird. Je mehr Zellen mit geschädigter Zellwand vorhanden sind, desto mehr LDH kann ins Medium abgegeben werden.

Bei der Etablierung des Assays an CEM/VLB-Zellen und an PBCEC-Zellen wurde sich an den Herstellerangaben in der Kitbeschreibung orientiert. Bei den CEM/VLB-Zellen erwies sich eine Zellzahl von 10.000 pro well als optimal, bei den PBCEC wurde auch in diesem Versuch die übliche Zahl von 40.000 pro well verwendet.

**Kontrollen:**

Es wurden jeweils 3 wells ohne Zellen nur mit KRB/Medium mitinkubiert, um eventuell im KRB/Medium vorhandenes LDH detektieren zu können.

Die spontane LDH-Freisetzung aus vitalen, nicht gestressten Zellen wurde durch Zellen bestimmt, die nicht mit Mediator sondern nur mit KRB/Medium behandelt wurden.

Die LDH-Aktivität, die sich maximal aus den eingesetzten Zellen freisetzen lässt und somit die extrazelluläre LDH-Aktivität bei einer Zelltodrate von 100% widerspiegelt, wird mittels Zellen bestimmt, die mit Triton-X-100 (Endkonzentration 1%) behandelt wurden.

Um Interaktionen der Testsubstanzen mit der Enzym- bzw. Farbstoffreaktion des Assays auszuschließen, wurden hohe Konzentrationen der Modulatorssubstanzen nur mit KRB/Medium inkubiert

**2.7.1 Messung an PBCEC-Zellen**

Die Zellen wurden einmal mit KRB gewaschen und dann mit 200µl KRB versetzt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden hinzugegeben und 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es wurden vorsichtig aus jedem well 100µl Überstand entnommen und in eine 96 well Platte mit flachem Boden überführt. Anschließend wurde 100µl der Reaktionsmischung (Katalysator + Farbstofflösung) in jedes well gegeben und noch weitere 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Platte mittels eines ELISA Readers vermessen.

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 2 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

### **2.7.2 Messung an CEM und VLB-Zellen**

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit Medium auf 100.000 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100µl wurden in eine 96well Platte gegeben und weitere 100 µl Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die jeweiligen Modulatorlösungen dazu pipettiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen zentrifugiert (150 x g, 10 min, Beckmann Allegra 6R) und 100µl des Überstandes vorsichtig entnommen. Nach Zugabe der Reaktionsmischung (Katalysator + Farbstofflösung) wurde weitere 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert und anschließend mittels ELISA-Reader vermessen.

Alle Konzentrationen wurden jeweils als Triplikate vermessen. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 2 weitere Wiederholungsversuche an anderen Tagen durchgeführt.

## **2.8 Behandlungsstudie an Mäusen**

Innerhalb der Akut- und der subchronischen Behandlungsstudie sollte untersucht werden, ob Johanniskrautextrakt einen Einfluß auf die Expression von Pgp im Gehirn hat. Zum anderen sollte gezeigt werden, ob sich die Verteilung (Plasma/Gehirn) von Corticosteron nach Johanniskrautbehandlung verändert. Als Standardantidepressivum wurde als Vergleichssubstanz Amitriptylin appliziert. Es wurden also insgesamt 3 Gruppen (Johanniskraut – Kontrolle – Amitriptylin) behandelt. In einer zweiten Studie sollten die Effekte von zwei weiteren Antidepressiva (Fluoxetin und Mirtazapin) auf o.g. Parameter untersucht werden.

### **Eingesetzte Konzentrationen:**

#### Akutstudien:

Johanniskrautextrakt (LI160, Ch. B.:02022680, Lichtwer): 500 mg/kg KG

Amitriptylin (Nattermann): 10 mg/kg KG

Fluoxetin (Flunaurin von Hexal, Ch. B.: ): 10 mg/kg KG

Mirtazapin (Remergil von Organon, Ch.B.: ): 10 mg/kg KG

Subchronische Studien:

Johanniskrautextrakt (LI160, Ch.B.: 02022680, Lichtwer): 300 mg/kg KG

Amitriptylin (Nattermann): 10 mg/kg KG

Fluoxetin (Fluneurin von Hexal, Ch. B.: ): 10 mg/kg KG

Mirtazapin (Remergil von Organon, Ch.B.: ): 10 mg/kg KG

**2.8.1 Tierhaltung und Behandlung**

Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen. Während der Studien wurden die Tiere zu fünf in Käfigen gehalten und erfuhren eine tägliche Gewichtskontrolle zum genauen Dosisabgleich. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur im Tierstall betrug 25°C bei konstanter Luftfeuchtigkeit und einem 12-Stunden Verdunklungs-Rhythmus. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich in Augenschein genommen und dokumentiert. Die Gesamtzahl der Tiere betrug in jeder Studie 30 Tiere (10 pro Gruppe).

Die Einzeldosis wurde den Tieren entweder mit zu untersuchendem Wirkstoff oder Vehikel (Suspension in Agarosegel 0,2%) per os mittels Schlundsonde (Metall-Knopfkanüle der Firma Aesculap, 1 mm Innendurchmesser) appliziert. Das Agarosegel wurde täglich frisch angesetzt und die Arzneistoffe wurden direkt vor der Behandlung suspendiert. Vor der Behandlung wurde die Suspension auf 37°C temperiert. Das maximale Applikationsvolumen betrug 0,4ml. Die eingesetzten Tagesdosen an Wirkstoff entsprachen Literaturangaben und waren nicht toxisch. Die Tiere wurden vor der Behandlung am Schwanz markiert, was für die Tiere nur eine geringe Belastung darstellt. Die Stress-Belastung bei der Behandlung war ebenfalls gering (siehe 3.5.2.1).

### 2.8.2 Akutstudien

- 1) Testung von Johanniskrautextrakt und Amitriptylin versus Agarosegel-Placebosuspension an männlichen NMRI-Mäusen, 2-3 Monate alt. Jeweils 10 Tiere pro Gruppe; Tötung der Tiere 1h nach Applikation.
- 2) Testung von Fluoxetin (Verreibung aus Fluneurin-Kapseln) und Mirtazapin (Verreibung von Remergil-Tabletten) versus Placebomischung in Agarosegelsuspension an männlichen NMRI-Mäusen, 2-3 Monate alt. Jeweils 10 Tiere pro Gruppe, Tötung der Tiere 1h nach Applikation.

Die Tiere wurden morgens früh aus dem Tierstall ins Labor gebracht und hatten noch einige Stunden um den Stress des Transportes zu verarbeiten. Dann wurden sie einzeln im Abstand von 5 min gewogen und dann per os mittels Schlundsonde gefüttert. Nach einer Stunde wurde den Tieren Blut entnommen und anschließend wurden sie durch zervikale Überstreckung getötet. Das Blut wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann Microfuge R). Des Weiteren wurde darauf das Gehirn entnommen und dessen Feuchtgewicht bestimmt.

Plasma- und Gehirnproben wurden bis zur Messung der einzelnen Parameter bei –80°C eingefroren.

### 2.8.3 Subchronische Studien

- 1) Testung von Johanniskrautextrakt und Amitriptylin versus Agarosegel-Placebosuspension an männlichen NMRI-Mäusen, 2-3 Monate alt über 14 Tage. Jeweils 10 Tiere pro Gruppe, Tötung an Tag 15.
- 2) Testung von Fluoxetin (Verreibung aus Fluneurin-Kapseln) und Mirtazapin (Verreibung von Remergil Tabletten) versus Placebomischung in Agarosegelsuspension an männlichen NMRI-Mäusen, 2-3 Monate alt. Jeweils 10 Tiere pro Gruppe, Tötung an Tag 15, 24h nach letzter Behandlung

Die Tiere wurden jeden Morgen zwischen 08.00 und 10.00 Uhr mittels Schlundsonde mit der Wirkstoffsuspension oder Placebo gefüttert. An Tag 15



wurde den Tieren nacheinander erst Blut entnommen und anschließend wurden sie mittels zervikaler Überstreckung getötet. Das Blut wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann Microfuge R). Das Gehirn wurde entnommen, dessen Feuchgewicht bestimmt und anschließend wurden Plasma und Gehirn bis zum Versuchstag bei –80°C eingeforen.

## **2.9 Corticosteron-Assay**

Der Correlate EIA Corticosterone Kit ist ein kompetitiver Immunoassay für die quantitative Bestimmung von Corticosteron in biologischen Flüssigkeiten. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Konkurrenz von in der Probe enthaltenem Corticosteron und zugegebenem konjugiertem Corticosteron um einen Antikörper gegen Corticosteron (Anleitung siehe auch <http://www.assaydesigns.com/products/catalog/inserts/900-097.pdf>). Laut Herstellerangabe können mit diesem Kit problemlos Plasmaproben vermessen werden.

Für die Hirnproben wurde das Assay hinsichtlich Anwendbarkeit, Verdünnung der Proben und Reproduzierbarkeit validiert. Um die Hirne vermessen zu können, wurden die Hirne mit Puffer 15 (2ml / 300 mg FG) versetzt und anschließend bei 1000 rpm zehnmal gepottet.

Es wurde das Plasma und Hirnproben der gefütterten Mäuse mit diesem Kit vermessen. Sowohl bei den Plasma- als auch bei den Hirnproben erwies sich eine Verdünnung von 1:20 am sinnvollsten.

Alle Proben – Plasma und Hirnhomogenat - wurden mit Steroid-Displacement Reagent aus dem Kit versetzt. Anschließend wurden die Proben mit Puffer 15 entsprechend verdünnt. Die Proben bzw eine Standardverdünnung von Corticosteron wurden dann in mitgelieferte, mit Antikörper beschichtete, 96 well Platten pipettiert. Es wurden das Corticosteron Konjugat und der Antikörper hinzugegeben und danach 2h bei RT inkubiert. Dabei wurde die Platte kontinuierlich geschüttelt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die wells durch Absaugen ausgeleert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die wells

wurden sorgsam von verbleibendem Waschpuffer befreit und die Substratlösung hinein pipettiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei RT ohne Schütteln wurde die Stop-Lösung hinzugegeben und die Platte am ELISA Reader (optische Dichte bei 405 nm) vermessen.

### Pipettierschema:

Well ID	Blank	TA	NSB	B <sub>0</sub>	Standard	Samples
Puffer 15			100 µl	100 µl		
Puffer 15			50 µl			
Standard/ Probe					100 µl	100 µl
Konjugat			50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Antikörper				50 µl	50 µl	50 µl
Inkubation 2h						
RT, Schütteln						
3x Waschen						
Konjugat		5 µl				
Substrat	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Inkubation 1h						
RT						
Stop-Lösung	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

### Kontrollen

- Blank: nur Substrat, weder Konjugat noch Antikörperlösung
- NSB (non specific binding): nur Konjugat, keine Antikörperlösung
- TA (total activity): Konjugatzugabe nach dem Waschen
- B<sub>0</sub>: Puffer + Konjugat + Antikörper

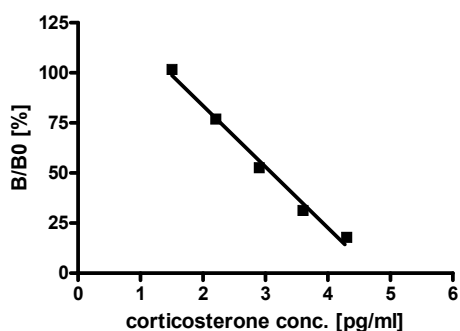


Abb. 2-4: Eichkurve Corticosteronassay

## **2.10 Western Blot**

Die Expression von Pgp wurde sowohl an der lymphozytären Zell-Linie als auch im Tiermodell an Maushirnhomogenat bestimmt. Es wurden unterschiedliche Primärantikörper verwendet: an den Zellen der Antikörper C19 aus der Ziege und am Hirnhomogenat der Antikörper C219 aus der Maus. Daraus resultieren auch unterschiedliche Zweitantikörper.

### **2.10.1 Probenaufarbeitung**

#### **2.10.1.1 CEM- und VLB-Zellen**

Zum Nachweis, dass Pgp überhaupt an den VLB-Zellen überexprimiert wird bzw an den CEM-Zellen nur basal exprimiert wird, wurden Western Blots mit einem Antikörper gegen Pgp durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit PBS gewaschen und gezählt. 5 Mio Zellen wurden mit 90 µl Sten Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min in flüssigen Stickstoff gehalten und anschließend abzentrifugiert (10.000 x g, 5 min, Beckmann Microfuge R). Der Überstand wurde zu gleichen Anteilen mit Sample-Buffer (2fach) verdünnt.

#### **2.10.1.2 Behandelte CEM- und VLB-Zellen**

Im nächsten Schritt wurden Zellen 24h mit Johanniskrautextrakt, Hyperforin und Quercetin in Medium in Kulturflaschen im Brutschrank vorinkubiert. Nach dem Abzentrifugieren des Mediums wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt, damit die gleichen Mengen Protein aufgetragen werden konnten und somit die Ergebnisse quantifizierbar waren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Sten-Puffer aufgenommen. Nachdem sie in flüssigen Stickstoff gehalten wurden, wurde der Überstand abzentrifugiert (10.000 x g, 5 min, Beckmann Microfuge R) und 1:1 mit Sample-Buffer versetzt.

### **2.10.2 Hirnhomogenat von Mäusen**

Die Hirne der Mäuse wurden in Puffer 15 bei 1000 rpm 10 mal gepottert. Im Anschluß wurden 100 µl des Hirnhomogenats abzentrifugiert (5000 x g, 10 min, 4°C, Beckmann Microfuge R) und das Pellet mit 100 µl Stenpuffer aufgenommen. Nach dem Homogenisieren wurde wiederum abzentrifugiert (10.000 x g, 4°C, Beckmann Microfuge R) und der Überstand 1:1 mit Sample-Buffer verdünnt. Aus dem Überstand des Hirnhomogenats vor Zugabe des Sample-Buffers wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt, so dass auch hier gewährleistet war, dass gleiche Mengen Protein auf das Gel aufgebracht wurden. Die Ergebnisse waren also ebenfalls quantifizierbar.

### **2.10.3 Gelelektrophorese**

Ein Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingebracht. Die Kammern wurden mit running buffer gefüllt und in die innere Kammer außerdem noch 125 µl DTT (2M) gegeben. Die jeweiligen Proben wurden in die Taschen des Gels eingebracht. Je nach Anzahl der Taschen des Gels wurde ein entsprechendes Probenvolumen gewählt. Durch vorhergehende Proteinbestimmung bzw. Auszählung der Zellzahl konnte gewährleistet werden, dass gleiche Mengen Protein in jeder Tasche aufgetragen waren. Der Vorlauf erfolgte bei 60 Volt für 8 min, der Hauptlauf bei 200 Volt für 45 min.

### **2.10.4 Blot**

Im Anschluß wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Das Gel und die Membran wurden in einem Blotting-Modul in die Kammer eingespannt. Die innere Kammer wurde mit transferbuffer gefüllt, die äußere mit kaltem Wasser. Der Transfer erfolgte bei 25 Volt für 1,5h.

### **2.10.5 Detektion**

Zur Überprüfung, ob der Transfer der Proteine auf die Membran stattgefunden hat, wurde die Membran einmal unspezifisch auf Vorhandensein von Protein mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Nach Abwaschen dieser Lösung wurde die Membran für 1h mit Block-Lösung geschüttelt. Nach erneutem Waschen wurde die erste Antikörperverschüttung (Zellen: Mdr (C-19): sc1517; Hirnhomogenat: monoclonal Antibody to Pgp (C219)) hinzugegeben und die Membran wurde über Nacht bei 8°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde nach 3 Waschschritten der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben und erneut 1h geschüttelt. Die Membran wurde erneut gewaschen und mit ECL-Reagenz benetzt. In einer speziellen Entwicklungskammer wurde dann ein Film belichtet (Entwicklungszeit 2 min).

Der belichtete Film wurde eingescannt (ScanWizard5, Microtec) und die eingescannten Bilder mittels Scion Image for windows (Version beta 4.0.2) densitometrisch ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

Um zu klären, ob sich ein Teil der Wirkung von diversen Antidepressiva über eine Modulation der HPA-Achse erklären läßt, wurden die Substanzen auf eine mögliche Beeinflussung der Transportaktivität von Pgp untersucht. Da - wie in der Einleitung erwähnt – postuliert wird, dass durch eine Hemmung von Pgp durch Antidepressiva der intrazelluläre Cortisolspiegel erhöht wird und es somit zu einer Normalisierung der Funktion der HPA-Achse kommt <sup>48</sup>.

Alle Substanzen wurden sowohl an den Schweinehirnkapillar-Endothelzellen untersucht als auch an den Lymphoblastomzellen. Somit konnte sowohl geklärt werden, ob das humane Pgp beeinflusst wird, als auch ob diese Beeinflussung eine Relevanz an der BBB besitzt. Die Daten zur Modulation von Pgp an beiden Zellsystemen werden unter 3.1 teils graphisch und teils tabellarisch dargestellt.

Im nächsten Schritt folgte die Untersuchung ob sich die Hemmung von Pgp, welche bei zahlreichen antidepressiven Substanzen beobachtet wurde, durch eine Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels erklären lässt. Pgp gehört als Mitglied der Familie der ABC-Transporter zu den Transportproteinen, welche die Energie für den Transport ihrer Substrate durch Spaltung von ATP gewinnen. Somit könnte es über eine Absenkung der intrazellulären Konzentration von ATP zu einer indirekten Interaktion mit Pgp kommen. Wenn sich solch eine indirekte Interaktion ausschließen lässt, kann man postulieren, dass es sich bei der Hemmung des Transporters um eine direkte Interaktion handeln muß. Graphische Darstellungen der Ergebnisse zu diesem Assay finden sich innerhalb dieses Abschnittes unter 3.2.

Es lassen sich aus den innerhalb dieser Arbeit verwendeten Assays keine Aussagen darüber treffen, ob es sich bei einer Hemmung von Pgp um eine Konkurrenz um den Transport handelt, also eine kompetitive Hemmung oder aber um eine allosterische Hemmung. Bei letztgenannter werden durch Bindung einer Substanz an den Transporter dessen Eigenschaft dahingehend verändert, dass Substrate nicht mehr gebunden und transportiert werden können. Im ersten Fall werden die Hemmstoffe also auch selbst transportiert, im

zweiten Fall sind sie selbst kein Substrat des Transporters. Die untersuchten Substanzen hemmen die Transportkapazität von Pgp – wenn überhaupt – nur in relativ hohen Konzentrationen, die wahrscheinlich keine klinische Relevanz besitzen. Dies schließt aber nicht aus, daß sie als Substrate von Pgp auch in wesentlich geringeren Konzentrationen selbst transportiert werden.

Eine Absenkung der intrazellulären Fluoreszenz im Calcein-Assay lässt sich durch zwei Mechanismen erklären. Zum einen kann es sich um eine Aktivierung der Transportfunktion von Pgp durch die modulierende Substanz handeln. Durch diese Aktivierung wird vermehrt Calcein-AM in der Zellmembran abgefangen und hinaus transportiert. Daher entsteht weniger intrazelluläres Calcein und die Fluoreszenz sinkt somit ab. Das Phänomen lässt sich aber auch ganz anders erklären. Wenn eine Substanz zelltoxische Effekte hat und innerhalb der Inkubationszeit die Zellen zerstört oder aber auch nur die Zellmembran porös werden lässt, kann das intrazellulär entstandene Calcein aus der Zelle gelangen. In den darauf folgenden Waschschritten wird es aus dem Assay entfernt. Letztendlich misst man dann ebenfalls eine abgesenkte intrazelluläre Fluoreszenz, die aber auf einem verstärkten Efflux von Calcein beruht und nicht auf einer geringeren Spaltung von Calcein-AM zu Calcein.

Aus diesem Grund wurden Substanzen, die im Calcein-Assay die Fluoreszenz senken, auf zelltoxische Effekte im LDH-Assay untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in diesem Abschnitt unter 3.3 dargestellt.

Des Weiteren sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden, ob Johanniskrautextrakt und einige ausgesuchte Standardantidepressiva einen Einfluß auf die Expression von Pgp haben. Diese Untersuchungen wurden *in-vitro* und *in-vivo* vorgenommen.

Die Ergebnisse, welche mit Johanniskrautextrakt, Hyperforin und Quercetin an den Lymphoblastomzellen bezüglich einer Modulation der Expression erhalten wurden, werden unter 3.4 genannt und dargestellt.

Johanniskrautextrakt, Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin wurden *in-vivo* dahingehend untersucht, ob sie die Proteinmenge von Pgp im Gehirn von Mäusen nach akuter bzw. subchronischer Behandlung verändern können. Graphische Darstellungen dieser Ergebnisse finden sich in diesem Kapitel unter 3.5.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Frage zu klären, ob Johanniskrautextrakt und einige andere Antidepressiva im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle die Verteilung von Corticosteron im Körper von Mäusen verändern können. Die Ergebnisse des Corticosteronassays aus den Plasma- und Hirnproben der gefütterten Tiere werden unter 3.5 genannt.

Im Vorfeld der Versuche waren zahlreiche Validierungen notwendig, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen werden soll. Wichtige Ergebnisse aus diesem Bereich sind unter Material und Methoden genannt und teilweise graphisch dargestellt.



### **3.1 Beeinflussung der Transportaktivität von P-Glykoprotein in zwei Zellmodellen**

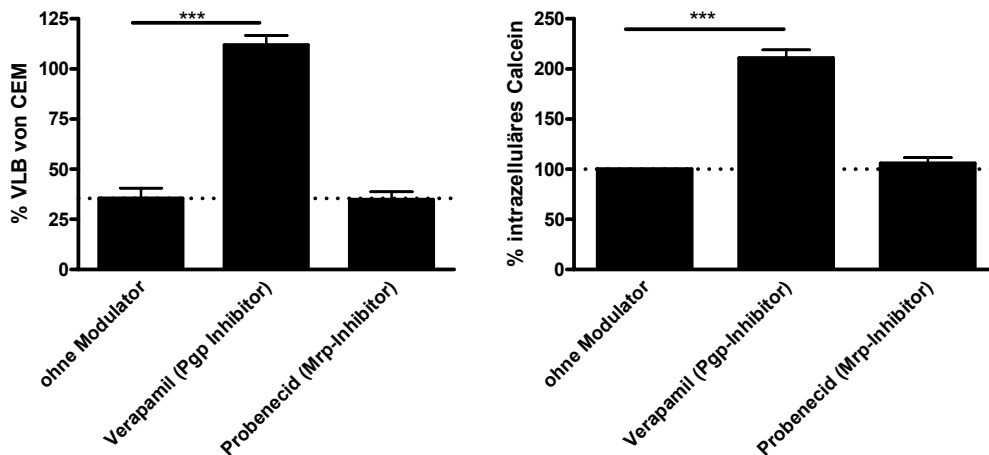
Als erstes sollen nun die Ergebnisse des Calcein-AM-Assays bezüglich der Untersuchung auf Inhibition oder Aktivierung von Pgp durch die getesteten Substanzen gezeigt werden.

Wie unter Material und Methoden genannt wurden zahlreiche Substanzen im Calcein-AM Assay bezüglich einer eventuell vorhandenen Modulation der Transportaktivität von Pgp untersucht. Diese Daten werden im Folgenden nach Gruppen gegliedert graphisch und tabellarisch dargestellt.

Eine Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz im Calcein-Assay bedeutet eine Hemmung von Pgp. Eine Absenkung der intrazellulären Fluoreszenz kann – wie einleitend erwähnt - durch zwei verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen kann es sich um eine Aktivierung der Transportfunktion von Pgp handeln. In diesem Fall würde mehr Calcein-AM durch Pgp in der Zellmembran abgefangen und direkt wieder ins umgebende Medium transportiert und demnach weniger intrazelluläres Calcein entstehen. Zum anderen kann es aber auch sein, dass die getestete Substanz zelltoxisch wirkt. Dadurch würde auch eine geringere intrazelluläre Fluoreszenz entstehen.

An der BBB wird nicht nur Pgp exprimiert sondern auch andere ATP-abhängige Effluxtransporter aus der Klasse der multidrug resistance associated proteins (Mrp). In den Schweinehirn-Endothelzellen konnten andere Arbeitsgruppen die Expression von Mrp1 und Mrp2 zeigen. Diese sind ebenfalls in der Membran von Lymphozyten zu finden. Um eine Beteiligung dieser Transporter im Calcein-AM Assay auszuschließen wurde an beiden Zellsystemen ein gängiger Mrp1 und Mrp2 Inhibitor getestet, denn Mrp1 und 2 sind beide in der Lage Calcein und Calcein-AM aus Zellen hinauszutransportieren. Probenecid wurde in der Konzentration 1mM eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-1 graphisch dargestellt. Verapamil wurde als gängiger Pgp Inhibitor ebenfalls mit vermessen. Wie man deutlich erkennen kann, hemmt Verapamil in beiden Zellsystemen Pgp hochsignifikant. Probenecid hat hingegen keinen Einfluß auf

die intrazelluläre Fluoreszenz. Das zeigt, dass die Mrp's in den in dieser Arbeit angewendeten Assays keinen Einfluß haben.



**Abb. 3-1: Modulation von Pgp durch Verapamil und Probenecid in beiden Zellsystemen**

*Einfluß von Verapamil (50 µM) und Probenecid (1 mM) auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Gestrichelte Linie: unbehandelte Zellen). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert ± SEM für n = 6 (VLB) und n = 5 (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.*

Von den meisten untersuchten Substanzen konnten keine EC50-Werte bestimmt werden, da keine Plateaueffekte erzielt wurden. Die EC50-Werte, die sich bestimmen ließen, sind entweder direkt im Ergebnisteil aufgeführt oder werden in der Diskussion genannt. Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet.

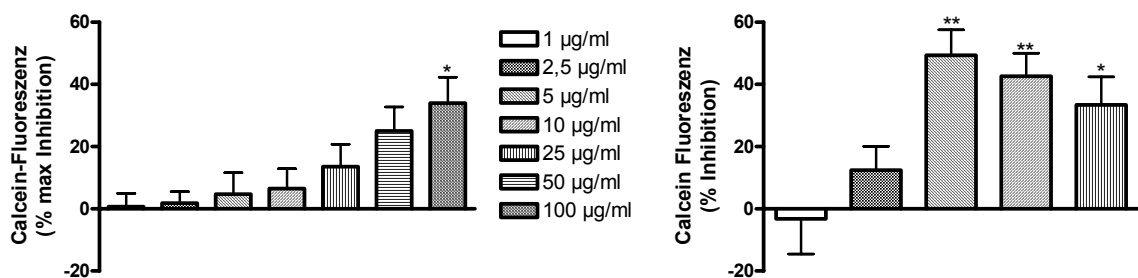
Bei nahezu allen Substanzen ist zu sehen, dass bei den PBCEC-Zellen öfters Schwankungen der Werte auftreten als bei den VLB-Zellen. Dieser Effekt lässt sich durch das Wachstum der PBCEC-Zellen erklären. Nach der Passage an Tag 4 wird eine definierte Menge Zellen in jedes well der 96-well Platte pipettiert. Allerdings ist nicht klar, ob in allen wells gleichmäßig viele Zellen anwachsen. Bei den Medienwechseln können somit unterschiedliche Zellmengen aus den wells entfernt werden. Daher ergeben sich leichte Schwankungen in den erhaltenen Werten. Die Zellzahl der VLB-Zellen lässt sich wesentlich genauer einstellen wodurch sich geringere Schwankungen auf Grund unterschiedlicher Zellzahlen im lymphozytären System zeigen als bei den PBCEC-Zellen.

### 3.1.1 Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe

In dem Calcein-AM Assay wurde an beiden Zellsystemen Johanniskrautextrakt und diverse wichtige Hauptinhaltsstoffe untersucht. An dieser Stelle werden die Ergebnisse, die mit einigen wichtigen Substanzen erhalten wurden, graphisch und die modulatorischen Eigenschaften aller Substanzen tabellarisch dargestellt.

#### 3.1.1.1 Extrakt

Der getestete Extrakt hemmt die Transportaktivität von Pgp in konzentrationsabhängiger Art und Weise. In Abb. 3-2 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.



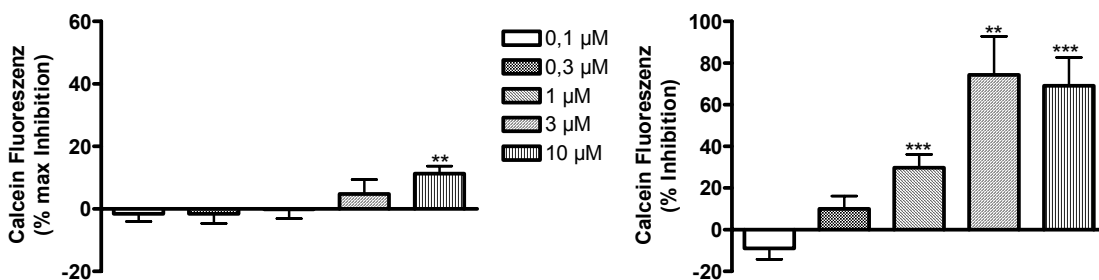
**Abb. 3-2: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt**

*Einfluß von Johanniskrautextrakt [µg/ml] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 5$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .*

In den Schweinehirnendothelzellen hemmt der Extrakt schon in wesentlich geringeren Konzentrationen den Transport von Calcein-AM signifikant als in den Lymphoblastomzellen.

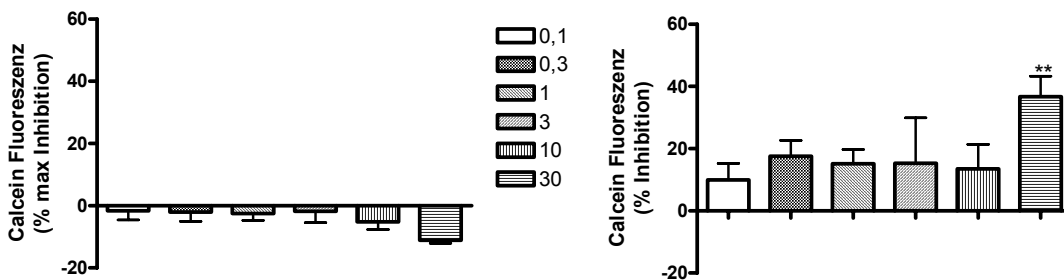
### 3.1.1.2 Hauptinhaltsstoffe

Um zu klären, durch welchen oder auch welche unterschiedlichen Inhaltsstoffe diese Hemmung bewirkt wird, wurden einzelne Hauptinhaltsstoffe des Extraktes ebenfalls bezüglich ihrer Inhibition der Transportaktivität von Pgp untersucht. Die Konzentration von Hyperforin, Hypericin und den Flavonoiden wird unter 2.2.1.2 genannt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Gesamthemmung des Extraktes nicht durch die Hemmung eines einzelnen Inhaltsstoffes erklären läßt. Mehrere Inhaltsstoffe hemmen in unterschiedlichem Ausmaß den Transport von Calcein-AM durch Pgp in beiden verwendeten Zellsystemen.



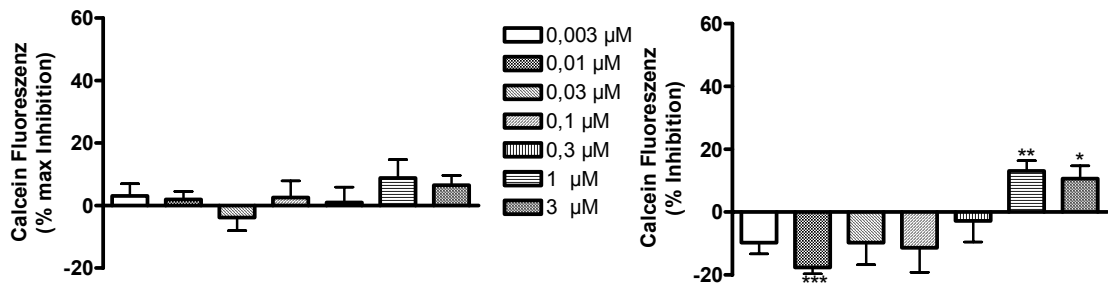
**Abb. 3-3: Modulation von Pgp durch Hyperforin-Na**

Einfluß von Hyperforin-Na [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 8$  (VLB) und  $n = 8$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-4: Modulation von Pgp durch Hypericin**

Einfluß von Hypericin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 5$  (VLB) und  $n = 5$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-5: Modulation von Pgp durch Quercetin**

Einfluß von Quercetin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 8$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: *t*-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Hyperforin hemmt in beiden Zellsystemen konzentrationsabhängig den Transport von Calcein-AM durch Pgp. Signifikante Effekte sieht man jedoch in beiden Zellsystemen in unterschiedlichen Konzentrationen. In PBCEC-Zellen hemmt Hyperforin in niedrigeren Konzentrationen als in VLB-Zellen. Hypericin hat in VLB-Zellen gar keinen signifikanten Effekt. Die Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz lässt sich nicht mit einer Aktivierung von Pgp begründen, sondern wahrscheinlich durch zelltoxische Effekte (3.3). In PBCEC-Zellen sieht man einen schwachen hemmenden Effekt. Dieser ist jedoch erst in relativ hohen Dosen signifikant und scheint daher keinen Beitrag zum hemmenden Effekt des Gesamtextraktes zu liefern. Quercetin, als eines der getesteten Flavonoide, zeigt einen sehr interessanten Effekt: in sehr niedrigen Konzentrationen aktiviert es Pgp und in höheren Konzentrationen inhibiert es die Transportfunktion von Pgp. Die Abnahme der Fluoreszenz bei niedrigen Konzentrationen lässt sich in diesem Fall nicht durch zelltoxische Effekte begründen und stellt damit eine tatsächliche Aktivierung dar.

Neben Hyperforin, Hypericin und Quercetin wurden die Flavonoide Hyperosid, Rutin, Amentoflavon und Biapigenin untersucht, zudem die Fraktion der oligomeren Procyanidine (OPC). Da mit keiner dieser Substanzen eine relevante Modulation der Transportaktivität von Pgp in einem der beiden Zellsystemen gesehen wurde, werden diese Daten hier nicht graphisch dargestellt. In Tabelle 3-1 (VLB-Zellen) und Tabelle 3-2 (PBCEC-Zellen) werden

die Konzentrationen der einzelnen Substanzen, mit welchen sich ein signifikanter Effekt ergibt, genannt. Die Schweinehirn-Endothelzellen reagieren wesentlich sensibler auf die Inhaltsstoffe des Extraktes. Jedoch ist auch hier eine eventuell vorhandene Hemmung nicht sehr deutlich.

#### Zusammenfassung:

Johanniskrautextrakt inhibiert konzentrationsabhängig den Transport von Calcein-AM durch Pgp. Von den untersuchten Inhaltsstoffen hemmen Hyperforin und Quercetin in beiden Zellsystemen signifikant die Transportaktivität. Quercetin weist einen biphasischen Effekt auf: es wirkt in sehr niedrigen, physiologischen Konzentrationen aktivierend und in eher hohen Konzentrationen hemmend. Die anderen getesteten Flavonoide inhibieren teils ebenfalls Pgp, allerdings erst in sehr hohen Konzentrationen und nicht sehr stark ausgeprägt.

**Tabelle 3-1: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe in VLB-Zellen.**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. Max Inhibition.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition	Substanz	% max Inhibition
Johanniskrautextrakt (6) 100 µg/ml	27,6 $\pm$ 6,9*	Rutin (6) 0,03-30 µM	n.e.
Hyperforin (8) 10 µM	11,27 $\pm$ 2,4**	Biapigenin (5) 0,1-100 µM	n.e.
Hypericin (5) 0,03-30 µM	n.e.	Amentoflavon (5) 0,1-100 µM	n.e.
Quercetin (8) 0,003-30 µM	n.e.	OPCs (4) 0,05-50 µg/ml	n.e.
Hyperosid (6) 0,03-30 µM	n.e.		

**Tabelle 3-2: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe in PBCEC-Zellen.**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

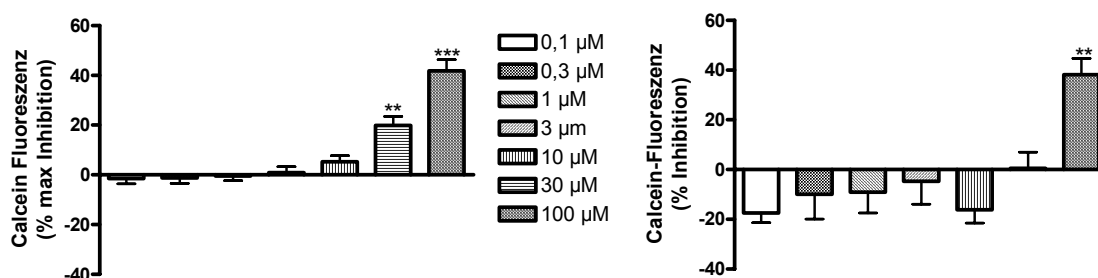
% Inhibition = gemessene Fluoreszenz resp. Fluoreszenz von unbehandelten Zellen

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% Inhibition	Substanz	% Inhibition
Johanniskrautextrakt (6)		Rutin (6)	
5 µg/ml	49,4 $\pm$ 8,2**	10 µM	23,2 $\pm$ 3,4**
10 µg/ml	42,6 $\pm$ 7,4**		
25 µg/ml	33,4 $\pm$ 8,9*		
Hyperforin (8)		Biapigenin (5)	
1 µM	32,6 $\pm$ 6,1***	10 µM	-16,1 $\pm$ 4,6*
3 µM	74,4 $\pm$ 18,5**	30 µM	30,1 $\pm$ 3,5**
10 µM	68,7 $\pm$ 14,5***		
Hypericin (5)		Amentoflavon (5)	
0,03-10 µM	n.e.	3 µM	-10,0 $\pm$ 3,8**
30 µM	36,7 $\pm$ 6,6**	30 µM	-14,3 $\pm$ 2,6*
Quercetin (6)		OPCs (6)	
0,01 µM	-17,6 $\pm$ 2,1***	50 µg/ml	28,1 $\pm$ 4,3**
1 µM	13,1 $\pm$ 3,2**		
3 µM	16,7 $\pm$ 1,6*		
Hyperosid (6)			
0,3 µM	17,1 $\pm$ 2,3***		
3 µM	28,3 $\pm$ 6,1**		

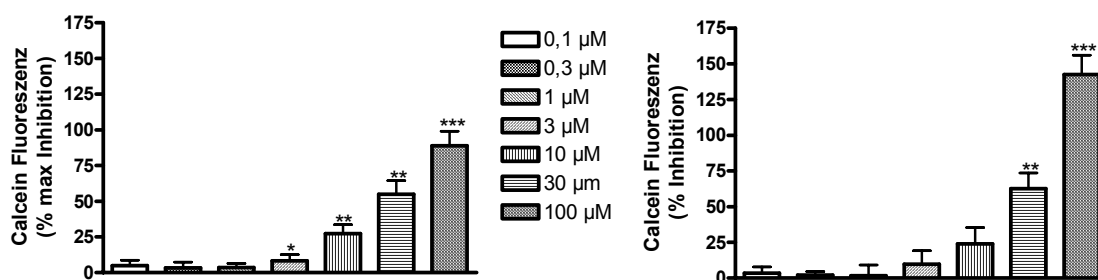
### 3.1.2 Tricyclische Antidepressiva

Auch die getesteten Tricyclika sind in der Lage konzentrationsabhängig die Transportfunktion von Pgp zu inhibieren. Graphisch wird beispielhaft die Hemmung des Transports von Calcein-AM durch Clomipramin und Amitriptylin dargestellt. Außerdem wird Opipramol graphisch gezeigt, weil es, wie in der Einleitung genannt, eine Sonderstellung unter den tricyclischen Antidepressiva einnimmt. Die Ergebnisse, die mit allen getesteten Tricyclika erhalten wurden, werden in Tabelle 3-3 (VLB-Zellen) und Tabelle 3-4 (PBCEC-Zellen) gezeigt.



**Abb. 3-6: Modulation von Pgp durch Amitriptylin**

Einfluß von Amitriptylin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 7$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



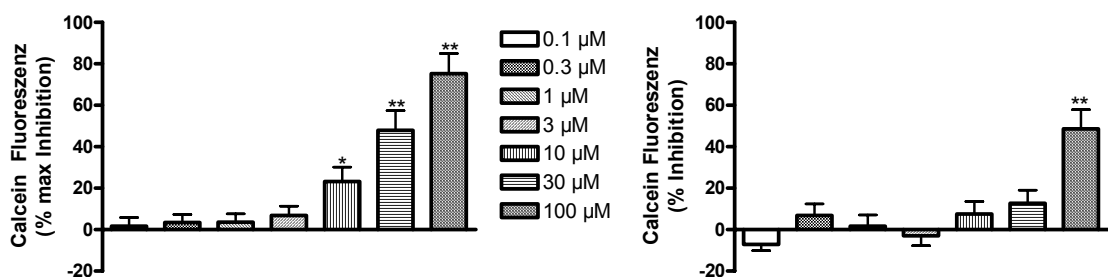
**Abb. 3-7: Modulation von Pgp durch Clomipramin**

Einfluß von Clomipramin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



Alle getesteten tricyclischen Antidepressiva hemmen die Transportkapazität von Pgp konzentrationsabhängig. In niedrigen Konzentrationen ist keine Modulation zu sehen – weder eine Hemmung noch eine Aktivierung – in höheren Konzentrationen inhibieren sie Pgp. Die Erniedrigung der intrazellulären Fluoreszenz durch Amitriptylin in PBCEC-Zellen ist in VLB-Zellen nicht reproduzierbar, daher auch nicht als Aktivierung anzusehen. Clomipramin hemmt in hohen Konzentrationen sehr stark und deutlich die Transportaktivität.

Opipramol, welches eine Sonderstellung in der Klasse der Tricyclika einnimmt, da es eine andere Wirkweise hat und nicht als Antidepressivum, sondern als Anxiolytikum eingesetzt wird, inhibiert ebenfalls die Transportaktivität von Pgp in höheren Konzentrationen.



**Abb. 3-8: Modulation von Pgp durch Opipramol**

*Einfluß von Opipramol [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 7$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .*

**Zusammenfassung:**

Betrachtet man die tricyclischen Antidepressiva lässt sich sagen, dass alle tricyclischen Antidepressiva, welche im Calcein-Assay an VLB- und PBCEC-Zellen untersucht wurden, die Transportkapazität von Pgp in höheren Konzentrationen inhibieren. Eventuelle Absenkungen der Fluoreszenz lassen sich nicht durch eine Aktivierung von Pgp erklären.

**Tabelle 3-3: Modulation von Pgp durch tricyclische Antidepressiva in VLB-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. max Inhibition.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition	Substanz	% max Inhibition
Imipramin (6)		Nortriptylin (7)	
30 $\mu$ M	22,1 $\pm$ 3,7**	10 $\mu$ M	16,0 $\pm$ 3,8 *
100 $\mu$ M	35,2 $\pm$ 7,0 **	30 $\mu$ M	24,6 $\pm$ 5,5 *
		100 $\mu$ M	38,5 $\pm$ 12,7 *
Clomipramin (6)		Desipramin (7)	
3 $\mu$ M	8,3 $\pm$ 4,4 *	3 $\mu$ M	6,9 $\pm$ 2,6 *
10 $\mu$ M	27,3 $\pm$ 6,3 **	10 $\mu$ M	14,8 $\pm$ 3,1 **
30 $\mu$ M	55,0 $\pm$ 9,5 **	30 $\mu$ M	27,3 $\pm$ 4,2 ***
100 $\mu$ M	88,8 $\pm$ 10,3 ***	100 $\mu$ M	40,0 $\pm$ 5,0 ***
Amitriptylin (7)		Opipramol (6)	
30 $\mu$ M	19,9 $\pm$ 3,6 **	10 $\mu$ M	23,3 $\pm$ 6,9*
100 $\mu$ M	41,8 $\pm$ 4,5 ***	30 $\mu$ M	48,0 $\pm$ 9,5 **
		100 $\mu$ M	75,3 $\pm$ 9,6 **

**Tabelle 3-4: Modulation von Pgp durch tricyclische Antidepressiva in PBCEC-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

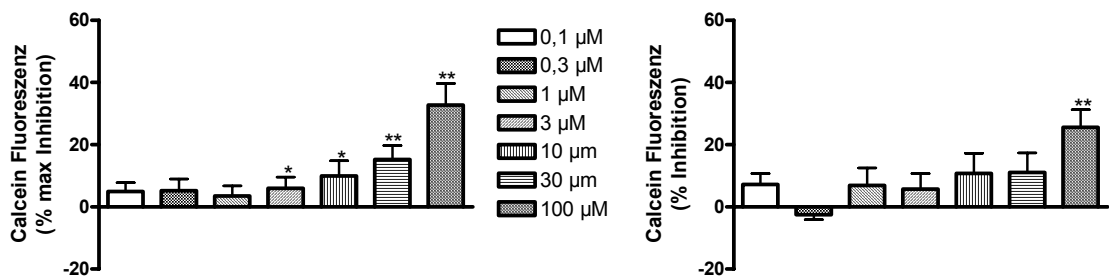
% Inhibition = gemessene Fluoreszenz resp. Fluoreszenz von unbehandelten Zellen

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% Inhibition	Substanz	% Inhibition
Imipramin (8)		Nortriptylin (6)	
100 $\mu$ M	40,8 $\pm$ 8,2 **	100 $\mu$ M	44,2 $\pm$ 10,1 **
Clomipramin (6)		Desipramin (8)	
30 $\mu$ M	62,6 $\pm$ 11,0 **	0,1 $\mu$ M – 100 $\mu$ M	n.e.
100 $\mu$ M	142,6 $\pm$ 13,5 ***		
Amitriptylin (6)		Opipramol (7)	
100 $\mu$ M	38,1 $\pm$ 6,6 **	100 $\mu$ M	48,6 $\pm$ 9,2 **

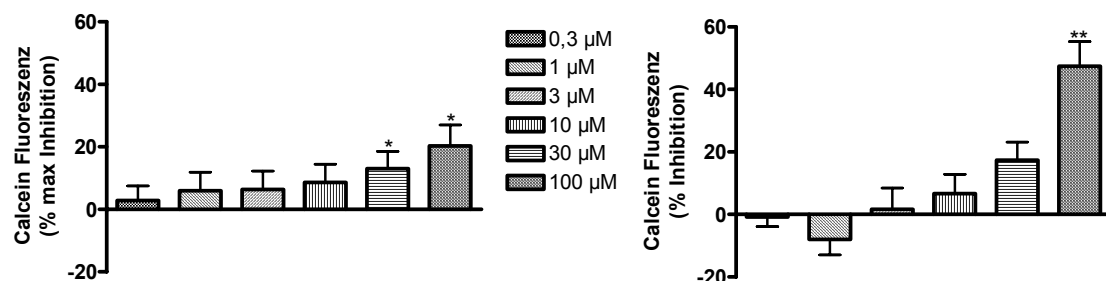
### 3.1.3 SSRI und SNRI

Neben den klassischen älteren tricyclischen Antidepressiva wurden in dieser Arbeit auch neuere antidepressiv wirksame Substanzen untersucht. Diese stammen aus den Klassen der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer und der selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer. Aus der zuerst genannten Klasse wurden zwei Substanzen untersucht, Fluoxetin und Citalopram. Die Ergebnisse bezüglich einer eventuellen Modulation der Transportaktivität von Pgp werden hier von beiden Substanzen graphisch dargestellt. Ebenfalls graphisch dargestellt werden die Ergebnisse, die mit Reboxetin, einem SNRI, erhalten wurden.



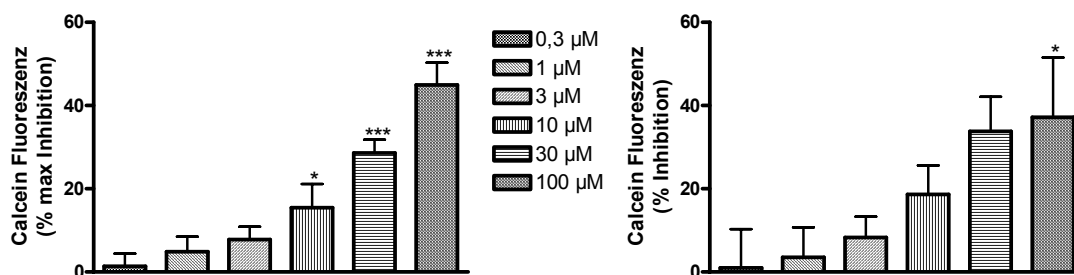
**Abb. 3-9: Modulation von Pgp durch Citalopram**

Einfluß von Citalopram [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: *t*-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-10: Modulation von Pgp durch Fluoxetin**

Einfluß von Fluoxetin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 5$  (VLB) und  $n = 7$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: *t*-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-11: Modulation von Pgp durch Reboxetin**

*Einfluß von Reboxetin [ $\mu\text{M}$ ] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 7$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .*

Citalopram hemmt Pgp schon in niedrigeren Konzentrationen signifikant im Vergleich zu Fluoxetin. Dieser Effekt ist allerdings eindeutig nur in VLB-Zellen zu erkennen. Insgesamt lässt sich aber sagen, dass beide SSRIs den Transport von Calcein-AM durch Pgp in beiden Zellsystemen konzentrationsabhängig hemmen, wobei Citalopram potenter erscheint als Fluoxetin. Das gleiche lässt sich auch über das SNRI Reboxetin sagen. Es inhibiert sowohl in VLB-Zellen als auch in PBCEC-Zellen die Transportaktivität von Pgp. In VLB-Zellen hemmt es schon in niedrigeren Konzentrationen signifikant im Vergleich zu in PBCEC-Zellen. Der Vollständigkeit halber sollen auch die Ergebnisse, die mit diesen drei Substanzen erhalten wurden, tabellarisch dargestellt werden. In Tabelle 3-5 (VLB-Zellen) und Tabelle 3-6 (PBCEC-Zellen) werden die jeweiligen Konzentrationen der Substanzen genannt, die Pgp signifikant inhibieren.

**Tabelle 3-5: Modulation von Pgp durch SSRIs und SNRIs in VLB-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. max Inhibition.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition
Fluoxetin (5)	
30 $\mu$ M	13,0 $\pm$ 5,5 *
100 $\mu$ M	20,3 $\pm$ 6,7 *
Citalopram (6)	
3 $\mu$ M	6,0 $\pm$ 3,5 *
10 $\mu$ M	10,0 $\pm$ 4,9 *
30 $\mu$ M	15,3 $\pm$ 4,5 **
100 $\mu$ M	32,8 $\pm$ 7,0 **
Reboxetin (6)	
10 $\mu$ M	15,4 $\pm$ 4,7 *
30 $\mu$ M	28,6 $\pm$ 3,2 ***
100 $\mu$ M	44,9 $\pm$ 5,4 ***

**Tabelle 3-6: Modulation von Pgp durch SSRIs und SNRIs in PBCEC-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

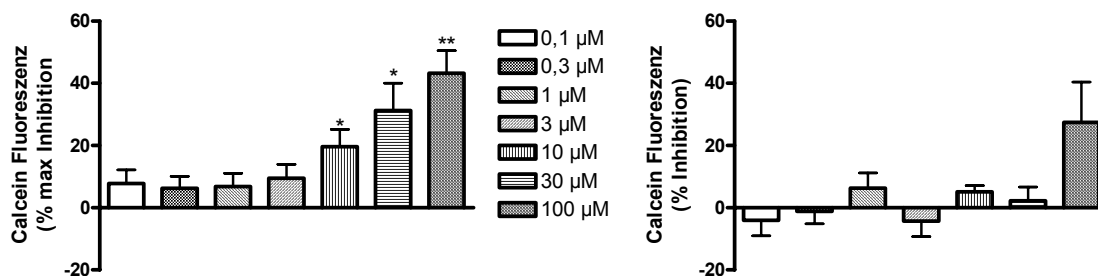
% Inhibition = gemessene Fluoreszenz resp. Fluoreszenz unbehandelter Zellen

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% Inhibition
Fluoxetin (7)	
100 $\mu$ M	47,4 $\pm$ 7,9 **
Citalopram (6)	
100 $\mu$ M	25,6 $\pm$ 5,6 **
Reboxetin (7)	
100 $\mu$ M	37,2 $\pm$ 14,3 *

### 3.1.4 Tetracyclika

Aus der Klasse der tetracyclischen Antidepressiva wurde Mirtazapin im Calcein-AM Assay an VLB- und PBCEC-Zellen untersucht. Auch diese Substanz ist wiederum in der Lage die Transportaktivität von Pgp zu inhibieren. Es lässt sich wie bei den zuvor genannten Antidepressiva ebenfalls erkennen, dass die Hemmung erst bei relativ hohen Konzentrationen einsetzt. In Abb. 3-12 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt und in Tabelle 3-7 (VLB) die signifikant inhibierenden Konzentrationen genannt.



**Abb. 3-12: Modulation von Pgp durch Mirtazapin**

Einfluß von Mirtazapin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4$  (VLB) und  $n = 5$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Tabelle 3-7: Modulation von Pgp durch Tetracyclika in VLB-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. max Inhibition.

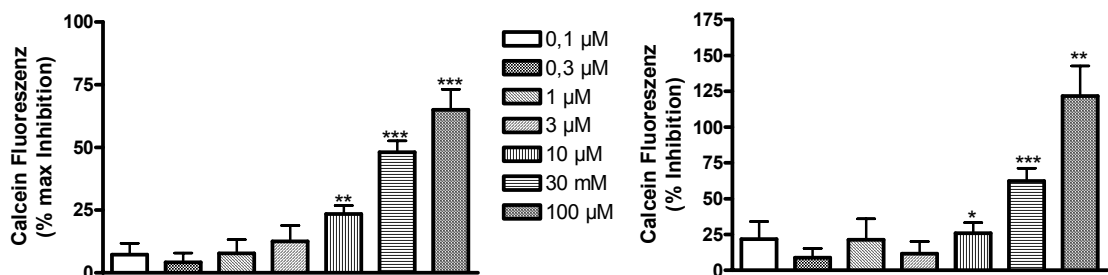
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition
Mirtazapin (4)	
10 µM	19,6 $\pm$ 5,5 *
30 µM	31,2 $\pm$ 8,8 *
100 µM	43,2 $\pm$ 7,3 **

Mirtazapin inhibiert den Calcein-AM Transport nur in der lymphozytären Zell-Linie VLB signifikant. In PBCEC-Zellen zeigt nur die höchste Konzentration von 100 µM die Tendenz Pgp zu hemmen.

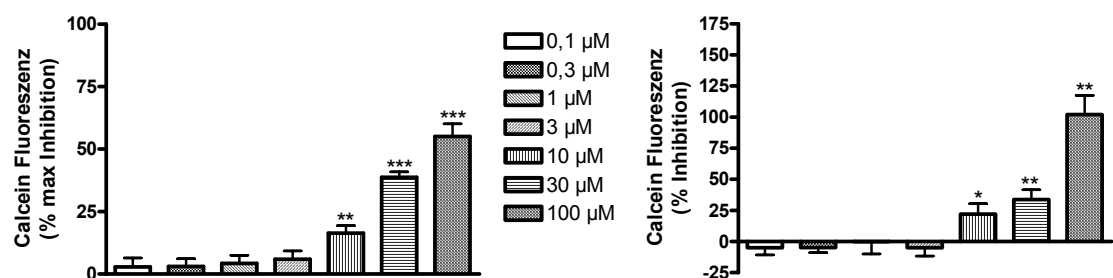
### 3.1.5 Antipsychotika

Als vergleichende Substanzen wurden innerhalb dieser Arbeit zusätzlich drei Antipsychotika untersucht. Da diese Substanzklasse, wie Antidepressiva im ZNS wirken, wurde sie ausgewählt. Sowohl Chlorpromazin als auch Haloperidol und Clozapin hemmen die Transportkapazität von Pgp in konzentrationsabhängiger Art und Weise in beiden Zellsystemen. Im Folgenden (Abb. 3-13, Abb. 3-14, Abb. 3-15) werden die erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt und die signifikant hemmenden Konzentrationen in Tabelle 3-8 (VLB-Zellen) und Tabelle 3-9 (PBCEC-Zellen) genannt.



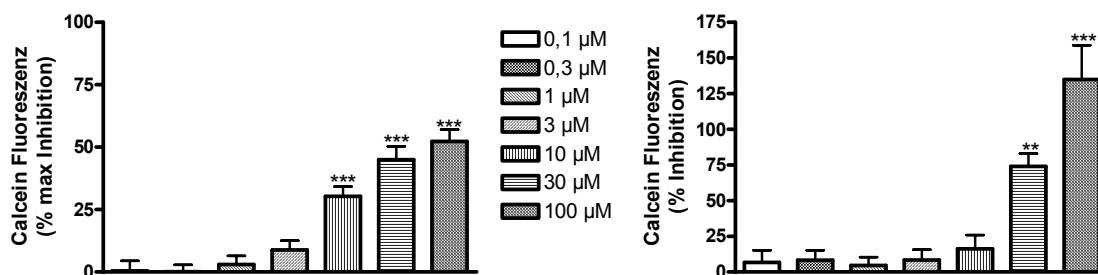
**Abb. 3-13: Modulation von Pgp durch Chlorpromazin**

Einfluß von Chlorpromazin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-14: Modulation von Pgp durch Clozapin**

Einfluß von Clozapin [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 6$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-15: Modulation von Pgp durch Haloperidol**

Einfluß von Haloperidol [ $\mu\text{M}$ ] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 8$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Alle getesteten Antipsychotika hemmen Pgp in beiden Zellsystemen in hohen Konzentrationen hoch signifikant. Die hier beobachtete Inhibition ist stärker ausgeprägt als bei den untersuchten Antidepressiva. Zudem ist sie in beiden Zellsystemen ähnlich stark ausgeprägt.

**Tabelle 3-8: Modulation von Pgp durch Antipsychotika in VLB-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. max Inhibition.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition
Chlorpromazin (6)	
10 $\mu\text{M}$	23,4 $\pm$ 3,5 **
30 $\mu\text{M}$	48,1 $\pm$ 4,5 ***
100 $\mu\text{M}$	65,0 $\pm$ 8,2 ***
Clozapin (6)	
10 $\mu\text{M}$	16,4 $\pm$ 2,9 **
30 $\mu\text{M}$	38,7 $\pm$ 2,2 ***
100 $\mu\text{M}$	55,1 $\pm$ 5,0 ***
Haloperidol (6)	
10 $\mu\text{M}$	30,3 $\pm$ 3,9 ***
30 $\mu\text{M}$	44,9 $\pm$ 5,4 ***
100 $\mu\text{M}$	52,3 $\pm$ 4,7 ***



**Tabelle 3-9: Modulation von Pgp durch Antipsychotika in PBCEC-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

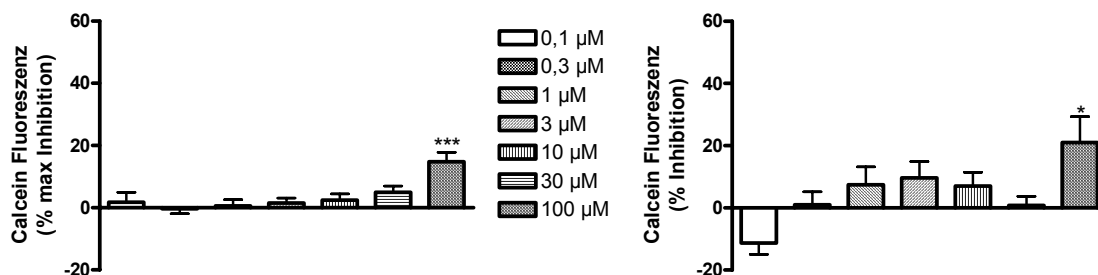
% Inhibition = gemessene Fluoreszenz resp. Fluoreszenz unbehandelter Zellen

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% Inhibition
Chlorpromazin (6)	
10 $\mu$ M	26,0 $\pm$ 7,4 *
30 $\mu$ M	62,4 $\pm$ 8,8 ***
100 $\mu$ M	121,6 $\pm$ 21,0 **
Clozapin (6)	
10 $\mu$ M	22,1 $\pm$ 8,3 *
30 $\mu$ M	33,7 $\pm$ 7,8 **
100 $\mu$ M	102,2 $\pm$ 15,4 **
Haloperidol (8)	
30 $\mu$ M	58,9 $\pm$ 12,1 **
100 $\mu$ M	134,0 $\pm$ 24,0 ***

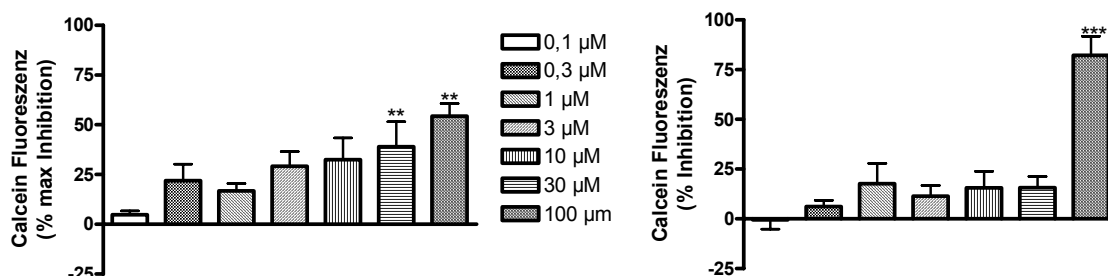
### 3.1.6 Corticoide

Da innerhalb dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden sollte, ob Antidepressiva einen Einfluß auf den Transport von Glucocorticoiden durch Pgp haben, wurde im Rahmen des Calcein-AM Assays an dieser Stelle geklärt, ob Glucocorticoide Pgp zu hemmen vermögen. Es wurden drei unterschiedliche Substanzen aus dieser Klasse in beiden zellulären Systemen untersucht. Die Datenlage in der Literatur zu allen drei Corticoiden ist sehr uneinheitlich, daher war es interessant zu klären, ob Cortisol, Corticosteron und Progesteron den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen und/oder PBCEC-Zellen hemmen. Die Ergebnisse werden im Folgenden von allen drei Substanzen graphisch dargestellt (Abb. 3-16, Abb. 3-17, Abb. 3-18) und am Ende die Konzentrationen, die Pgp signifikant inhibieren, in Tabelle 3-10 (VLB-Zellen) und Tabelle 3-11 (PBCEC-Zellen) gezeigt.



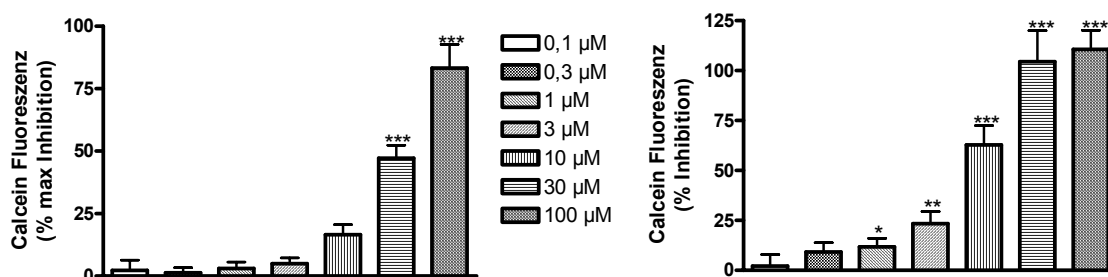
**Abb. 3-16: Modulation von Pgp durch Cortisol**

Einfluß von Cortisol [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 7$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-17: Modulation von Pgp durch Corticosteron**

Einfluß von Corticosteron [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 5$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-18: Modulation von Pgp durch Progesteron**

Einfluß von Progesteron [µM] auf den Transport von Calcein-AM in VLB-Zellen (links) und PBCEC-Zellen (rechts). Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  (VLB) und  $n = 7$  (PBCEC); Werte als Triplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Von den drei untersuchten Glucocorticoiden ist Progesteron der stärkste Modulator von Pgp und hemmt in beiden Zellsystemen die Transportaktivität von Pgp sehr deutlich. Der Effekt ist in PBCEC-Zellen schon bei geringen Konzentrationen signifikant. Cortisol und Corticosteron hemmen den Transport von Calcein-AM in beiden verschiedenen Zellsystemen weniger potent als Progesteron. Jedoch ist auch bei Corticosteron und Cortisol eine Inhibition von Pgp ersichtlich. Wenn man die drei Substanzen nach ihrer Inhibitor-Potenz ordnet, folgt nach dem stärksten Inhibitor – Progesteron – Corticosteron und Cortisol ist der schwächste Hemmer von Pgp in den hier gezeigten Assays. Alle drei Glucocorticoide hemmen demnach Pgp, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt und in unterschiedlichen Konzentrationen. Eine Aussage, ob diese Glucocorticoide über Pgp transportiert werden, lässt sich anhand dieses Assays nicht treffen. Wenn die Substanzen von Pgp transportiert werden, kann dieser Transport auch in physiologischen Konzentrationen Relevanz besitzen, wenn die Hemmung von Pgp noch nicht zu sehen ist.

**Tabelle 3-10: Modulation von Pgp durch Glucocorticoide in VLB-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% max Inhibition = gemessene Inhibition resp. max Inhibition.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% max Inhibition
Cortisol (6)	
100 $\mu$ M	14,7 $\pm$ 3,1 ***
Corticosteron (6)	
30 $\mu$ M	39,0 $\pm$ 12,4 **
100 $\mu$ M	54,3 $\pm$ 6,4 **
Progesteron (6)	
30 $\mu$ M	47,2 $\pm$ 5,2 ***
100 $\mu$ M	83,2 $\pm$ 10,0 ***

**Tabelle 3-11: Modulation von Pgp durch Glucocorticoide in PBCEC-Zellen**

Werte dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM für (n) Experimente.

% Inhibition = gemessene Fluoreszenz resp. Fluoreszenz unbehandelter Zellen

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.e. = kein Effekt

Substanz	% Inhibition
Cortisol (7)	
100 $\mu$ M	21,0 $\pm$ 8,4 *
Corticosteron (5)	
100 $\mu$ M	82,2 $\pm$ 9,5 ***
Progesteron (7)	
1 $\mu$ M	11,7 $\pm$ 4,3 *
3 $\mu$ M	23,4 $\pm$ 6,1 **
10 $\mu$ M	62,7 $\pm$ 9,7 ***
30 $\mu$ M	104,5 $\pm$ 15,5 ***
100 $\mu$ M	110,6 $\pm$ 9,5 ***

### 3.2 Einfluss auf den intrazellulären ATP-Spiegel

Pgp gehört wie einleitend erwähnt zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette transporter). Es handelt sich um eine Klasse von energieabhängigen Transportern, die ATP hydrolysieren um Energie für den Transport ihrer Substrate zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass bei zu geringem intrazellulären ATP-Spiegel, wenn die metabolische Kapazität einer Zelle beispielsweise durch  $\text{NaN}_3$  gestört wird, diese Transporter nicht mehr in der Lage sind ihre Transportfunktion auszuüben. Vor diesem Hintergrund sollte überprüft werden, ob die Hemmung der Transportfunktion von Pgp, die im Calcein-AM Assay gesehen wurde, eventuell auf einer Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels beruht. Eine solche indirekte Hemmung würde bedeuten, dass die Substanzen nicht selbst an Pgp binden und nicht direkt mit Pgp interagieren. Wenn es durch die modulierenden Substanzen zu keiner Absenkung des ATP-Spiegels kommt, kann postuliert werden, dass eine Hemmung von Pgp auf einer direkten Interaktion beruht. Diese direkte Interaktion kann eine Konkurrenz um den Transporter sein (kompetitive Hemmung) oder aber auch eine Bindung und daraus resultierende Veränderung der Transportfunktion (allosterische Hemmung).

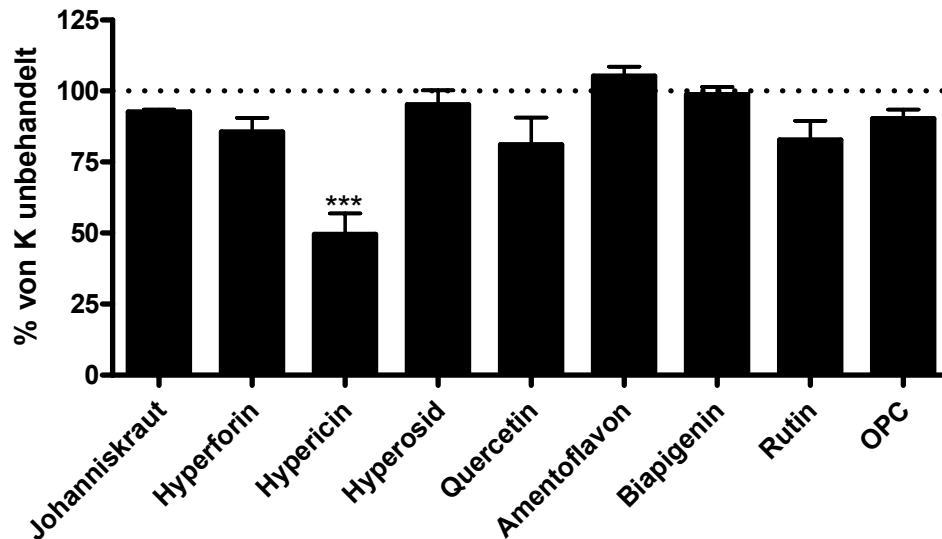
Die Untersuchung des ATP-Spiegels erfolgte mit einem gängigen Kit, dessen Wirkweise unter 2.6 beschrieben wurde. Modellhaft soll der Einfluß durch Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe auf den ATP-Spiegel in beiden Zellsystemen – Lymphoblastomezellen und Schweinehirn Kapillarendothelzellen - gezeigt werden. Alle anderen Substanzen wurden nur an VLB-Zellen getestet.

Die Substanzen wurden in den Konzentrationen 30 µM oder 100 µM eingesetzt. Diese Überlegung beruht darauf, dass mit diesen Konzentrationen im Calcein-AM Assay eine ausgeprägte Hemmung beobachtet wurde. Als Kontrollsubstanz diente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Von dieser Substanz gab es in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen, die zeigen konnten, dass es ab Konzentrationen von 3 µM den intrazellulären ATP-Spiegel senkt. Am deutlichsten werden diese Effekte bei 100 µM. An jedem Versuchstag wurde somit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 100 µM mitgetestet.

Da untersucht werden sollte, ob die Substanzen unter gleichen Bedingungen wie im Calcein-AM Assay in der Lage sind, die Konzentration von ATP zu senken wurde als Inkubationszeit 45 min gewählt. Die Gesamtinkubationszeit im Calcein-AM Assay beträgt ebenfalls 45 min.

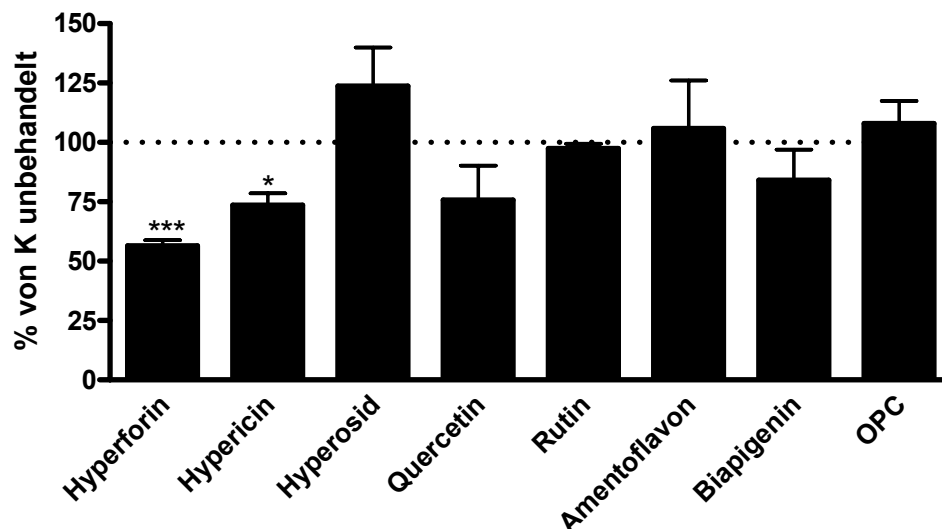
### **3.2.1 Johanniskrautextrakt**

Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe wurden - wie oben erwähnt - an beiden zellulären Systemen im ATP Assay getestet. Aufgrund zelltoxischer Effekte in hohen Konzentrationen wurde der Extrakt selbst nicht an Schweinehirn Kapillarendothelzellen getestet. Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt, OPC ebenfalls von 50 µg/ml und die anderen Inhaltsstoffe jeweils in einer Konzentration von 30 µM.



**Abb. 3-19:** Einfluß von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen

Eingesetzte Konzentrationen: JK-Extrakt und OPC: 50 µg/ml, alle anderen: 30 µM. Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Unbehandelte Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-20:** Einfluß von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen auf den intrazellulären ATP-Spiegel in PBCEC-Zellen

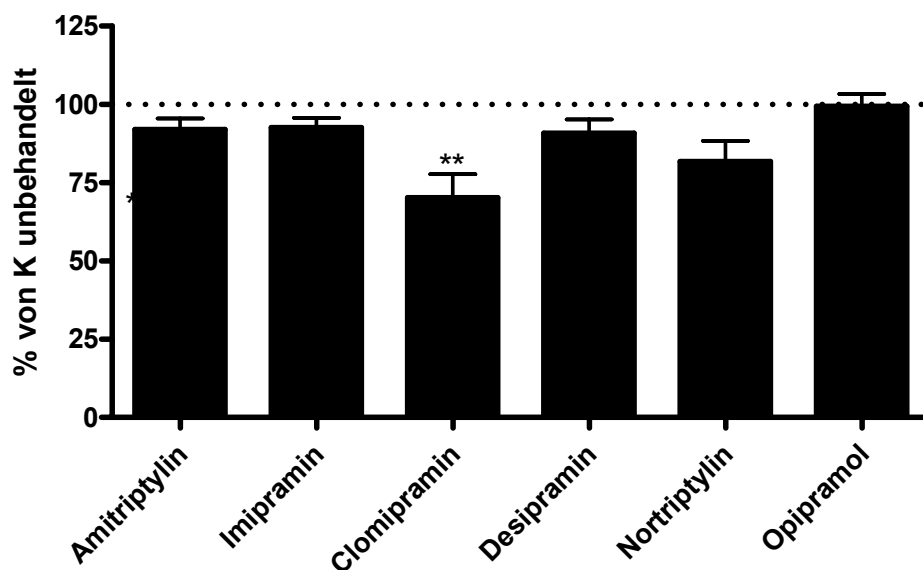
Eingesetzte Konzentrationen: JK-Extrakt und OPC: 50 µg/ml, alle anderen: 30 µM. Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Unbehandelte Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

In den Lymphoblastomzellen senkt nur Hypericin den intrazellulären ATP-Spiegel ab und die anderen Substanzen sind ohne Effekt. In den PBCEC-Zellen ergibt sich ein etwas anderes Bild. Johanniskrautextrakt selbst sowie Hyperforin

und Hypericin senken die Konzentration von intrazellulärem ATP signifikant ab. Es lässt sich erkennen, daß beide Zellsysteme unterschiedlich sensitiv auf die einzelnen Substanzen reagieren. Die Schweinehirnkapillarendothelzellen sind wesentlich empfindlicher als die Lymphoblastomzellen. Ob diese Senkung des intrazellulären ATP-Spiegels einen Einfluß auf die Transportaktivität hat, wurde im Folgenden untersucht (3.2.5).

### 3.2.2 Tricyclische Antidepressiva

Die innerhalb dieser Arbeit untersuchten tricyclischen Antidepressiva wurden - wie einleitend erwähnt - nur an den Lymphoblastomzellen bezüglich ihres Einflusses auf den intrazellulären ATP-Spiegel untersucht. Abb. 3-21 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.



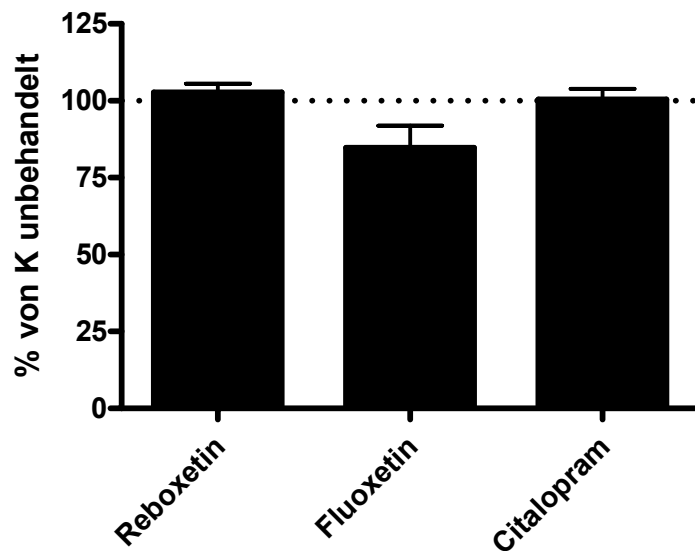
**Abb. 3-21: Einfluß von tricyclischen Antidepressiva auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen**

Eingesetzte Konzentrationen: 100  $\mu\text{m}$ . Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Unbehandelte Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ausschließlich Clomipramin senkt den intrazellulären ATP-Spiegel ab. Alle anderen Substanzen haben innerhalb dieses Assays keinen Effekt.

### 3.2.3 SSRI und SNRI

Reboxetin als selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer hat keinen Effekt auf den intrazellulären ATP-Spiegel. Die beiden selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer zeigen ebenfalls keinen Effekt auf die Konzentration von intrazellulärem ATP innerhalb der gewählten Inkubationszeit. Alle drei Substanzen wurden in der Konzentration von 100  $\mu$ M untersucht, da sich in dieser Konzentration jeweils eine signifikante Hemmung des Transports von Calcein-AM zeigte. Die Ergebnisse des ATP-Assays mit diesen drei Substanzen sind in Abb. 3-22 graphisch dargestellt.



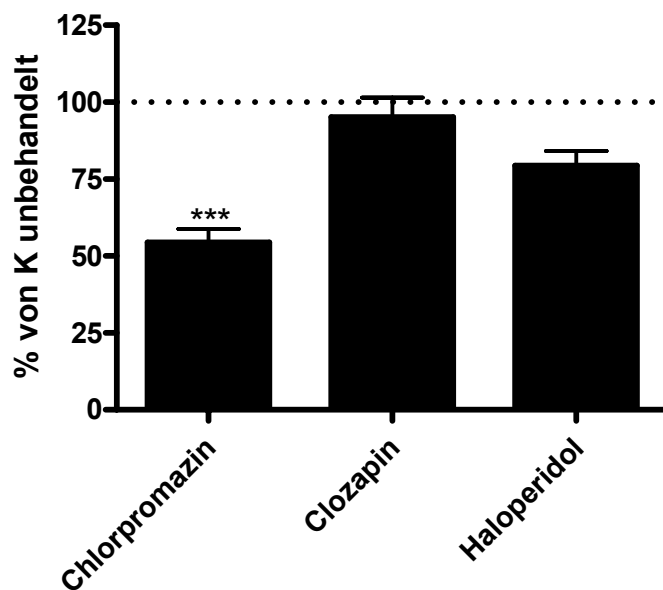
**Abb. 3-22: Einfluß von SSRIs und SNRIs auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen**

Eingesetzte Konzentrationen: 100  $\mu$ M. Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Unbehandelte Kontrolle = 100 %. Statistik: *t*-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



### 3.2.4 Antipsychotika

Auch die als Kontrollsubstanz dienenden Antipsychotika wurden bezüglich ihres Einflusses auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen untersucht. Chlorpromazin senkt die Konzentration von intrazellulärem ATP signifikant ab. Die beiden anderen untersuchten Substanzen, Clozapin und Haloperidol, haben keinen Effekt. In Abb. 3-23 sind die erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt.



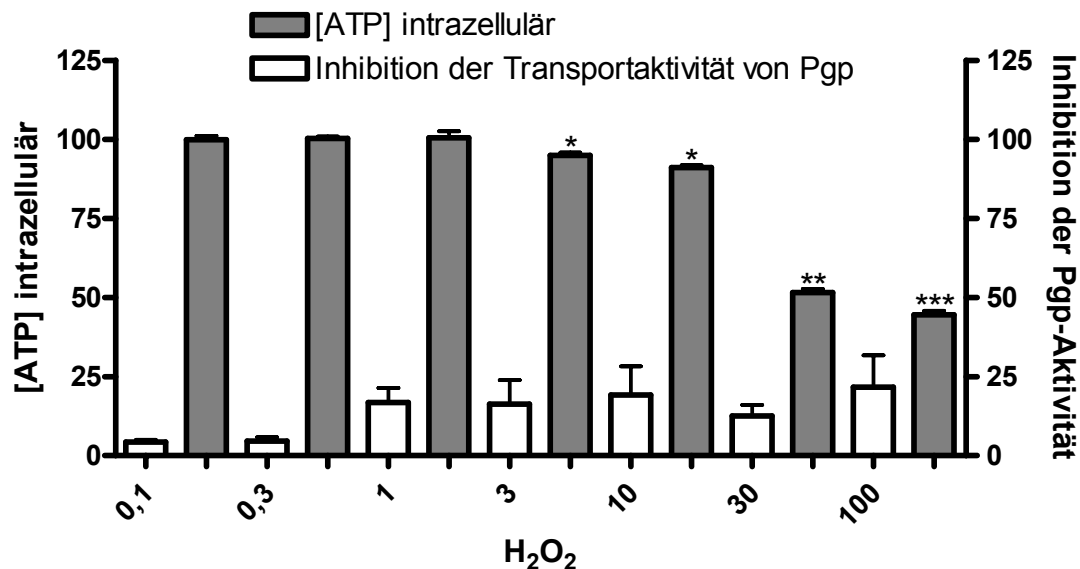
**Abb. 3-23: Einfluß von Antipsychotika auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen**

Eingesetzte Konzentrationen: 100  $\mu\text{m}$ . Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Unbehandelte Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.5 Gegenüberstellung ATP- und Calcein-AM-Assay

Da bei einigen Substanzen innerhalb dieses Assays eine Abnahme des intrazellulären ATP-Spiegels beobachtet wurde, wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Effekt einen Einfluß auf die Transportaktivität von Pgp haben kann. Zu diesem Zweck wurde in beiden Assays (ATP und Calcein-AM) eine Konzentrationsreihe mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt. Von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  wurde der Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum einen bezüglich der Senkung des intrazellulären ATP-Spiegels bestimmt und zum anderen bezüglich der Modulation des Transports

von Calcein-AM durch Pgp. Abb. 3-24 zeigt die in beiden Assays erhaltenen Ergebnisse.



**Abb. 3-24: Gegenüberstellung ATP-Spiegel und Hemmung des Calcein-AM-Transports**

Weisse Balken: Modulation des Calcein-AM Transports durch Pgp in VLB-Zellen,  $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  SEM. Graue Balken: Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels in VLB-Zellen,  $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, one-way-anova, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Aus dieser Graphik geht hervor, dass selbst eine Absenkung des intrazellulären ATPs um 50% keinen Einfluß hat auf die Transportaktivität von Pgp.

Dieser Versuch macht deutlich, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eindeutig den intrazellulären ATP-Spiegel absenkt. Ab 3 μM ist diese Absenkung signifikant. Jedoch wird ebenfalls ersichtlich, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in keiner der untersuchten Konzentrationen einen Einfluß auf die Transportaktivität von Pgp hat. Es ist keine signifikante Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz sichtbar. Diese Gegenüberstellung zeigt, dass eine Absenkung der intrazellulären Konzentration von ATP selbst um 50% keinerlei Modulation der Transportkapazität von Pgp zeigt. Calcein-AM wird weiterhin ungehindert mittels Pgp vom Zellinneren ins umgebende Medium transportiert. Somit wird die Senkung des ATP-Spiegels durch die verschiedenen Antidepressiva und Antipsychotika keinen Einfluß auf die Transportaktivität von Pgp haben.

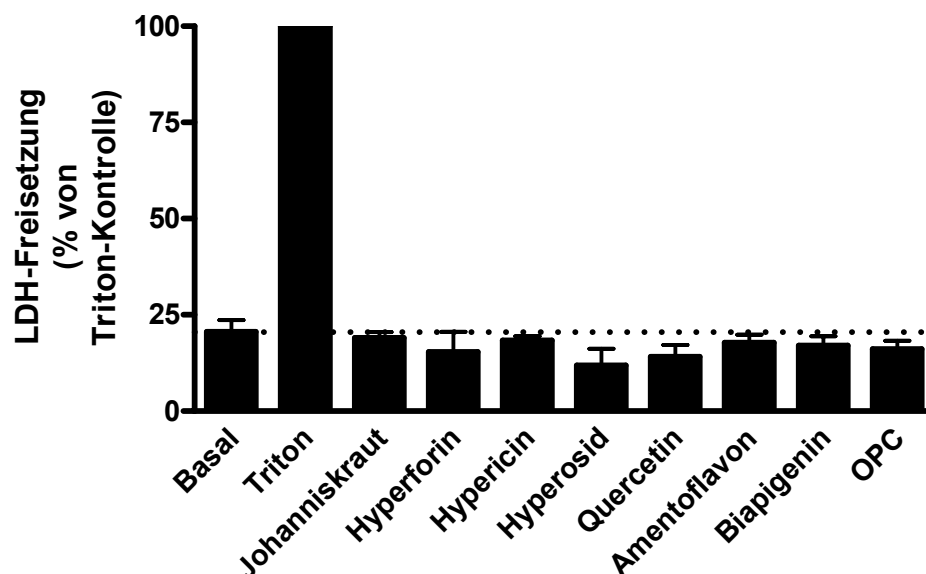
### **3.3 Zelltoxische Effekte**

Es galt es zu klären, ob sich eine Verminderung der intrazellulären Fluoreszenz durch eine Aktivierung oder durch zelltoxische Effekte erklären lässt. Bei einigen der untersuchten Substanzen ließ sich eine Verminderung der Akkumulation von intrazellulärem Calcein im Calcein-AM Assay beobachten. Bei allen diesen Substanzen handelt es sich um Inhaltsstoffe des Johanniskrautextraktes, also um natürliche Substanzen. Die anderen untersuchten Antidepressiva, Antipsychotika und Corticoide zeigten alle nur eine Hemmung des Transports von Calcein-AM. Die Abschwächung der intrazellulären Fluoreszenz kann nun zwei verschiedene Erklärungen haben. Zum einen zeigt sich eine Aktivierung der Transportfunktion von Pgp durch eine verringerte intrazelluläre Calcein Fluoreszenz. Zum anderen würde aber auch ein zelltoxischer Effekt bewirken, dass weniger Calcein akkumuliert. Daher wurden Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe auf eventuelle zelltoxische Effekte im LDH-Assay untersucht.

Als Kontrollsubstanz in diesem Assay diente Triton-X-100 (Endkonzentration im Assay: 1%). Der zelltoxische Effekt, welcher sich mit Triton-X-100 zeigte, wurde als 100% gesetzt und die anderen Substanzen darauf bezogen. Diese Untersuchungen wurden an beiden Zellsystemen durchgeführt: sowohl an den Lymphoblastomzellen VLB als auch an den Schweinehirnkapillarendothelzellen PBCEC. An beiden Zellsystemen wurden als weitere Kontrolle unbehandelte Zellen mitgeführt, um die basale Zelltoxizität berücksichtigen zu können.

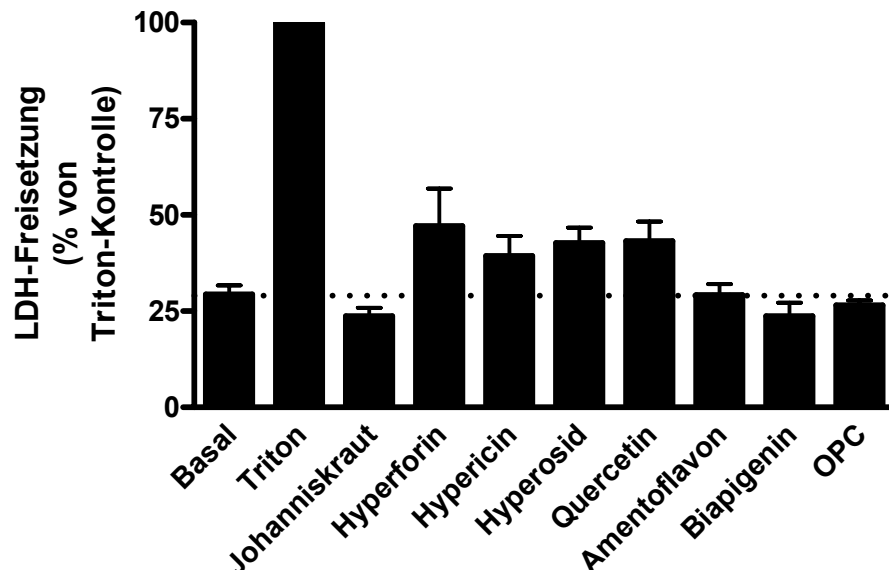
Als Inkubationszeit wurde wiederum 45 min, wie innerhalb des Calcein-AM Assays, gewählt. Denn hier sollte untersucht werden, ob sich Effekte, die im Calcein-AM Assay zu sehen waren, durch eventuelle Toxizität erklären lassen.

In den Abbildungen Abb. 3-25 und Abb. 3-26 sind die Ergebnisse des LDH Assays graphisch dargestellt. Eingesetzt wurden jeweils die Konzentrationen, bei denen im Calcein-AM Assay eine Absenkung der Fluoreszenz zu sehen war.



**Abb. 3-25: Potentielle zelltoxische Effekte von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen in VLB-Zellen**

Konzentrationen: Quercetin: 0,01  $\mu$ M, Rest: 30  $\mu$ M. Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6-8$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Triton-Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 3-26: Potentielle zelltoxische Effekte von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen in PBCEC-Zellen**

Konzentrationen: Quercetin: 0,01  $\mu$ M, Rest: 30  $\mu$ M. Darstellung der Ergebnisse: Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  Versuche, ausgeführt in Triplikaten. Triton-Kontrolle = 100 %. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

In keinem der beiden Zellsysteme ließen sich zelltoxische Effekte der untersuchten Substanzen erkennen.

Zusammenfassung:

im LDH-Assay lässt sich weder in den VLB-Zellen noch in den PBCEC-Zellen ein Anstieg an sezernierter Lactatdehydrogenase erkennen. Das bedeutet, dass keine der untersuchten Substanzen in den genannten Konzentrationen in der Inkubationszeit von insgesamt 45 min zelltoxische Effekte aufweist.

### ***3.4 Beeinflussung der Expression von P-Glykoprotein im zellulären System***

Innerhalb des Calcein-AM Assays wurden nur Effekte untersucht, die die Substanzen innerhalb von 45 min Inkubation auf die Zellen ausüben. Effekte, die sich erst nach längerer Zeit zeigen, wie zum Beispiel eine Modulation der Genexpression, konnten nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde noch ein weiteres Assay etabliert, in dem untersucht wurde, ob die Inkubation mit unterschiedlichen Substanzen einen Einfluß auf die Menge an exprimiertem Pgp hat.

Zu diesem Zweck wurden die Lymphoblastomzellen 24h mit den modulierenden Substanzen inkubiert. Diese Zeit hat sich als sinnvoll erwiesen, um eine Erhöhung oder Absenkung der Pgp Proteinmenge zu detektieren. Danach wurden die Zellen lysiert und das Gesamtlisat nach gelelektrophoretischer Trennung im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Pgp untersucht. Die erhaltenen Blots wurden nach Entwicklung densitometrisch ausgewertet.

Als Ergebnis wird jeweils der Ausschnitt aus einem repräsentativen Western Blot gezeigt und danach die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung dieses Blots graphisch dargestellt. Die Versuche wurden jeweils noch an zwei unabhängigen Versuchstagen wiederholt und die Ergebnisse bestätigt.

Zur Etablierung wurden zuerst unbehandelte Zelle im Western Blot bezüglich der Expression von Pgp untersucht. Wie zu erwarten zeigte sich, dass CEM-Zellen sehr wenig Pgp exprimieren, während die VLB-Zellen ungefähr 10 mal soviel Pgp in ihrer Zellmembran enthalten und damit Pgp überexprimieren.

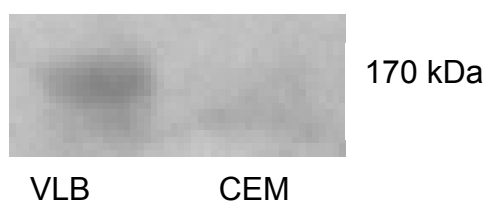


Abb. 3-27: Western Blot von CEM- (rechts) und VLB-Zellen (links)

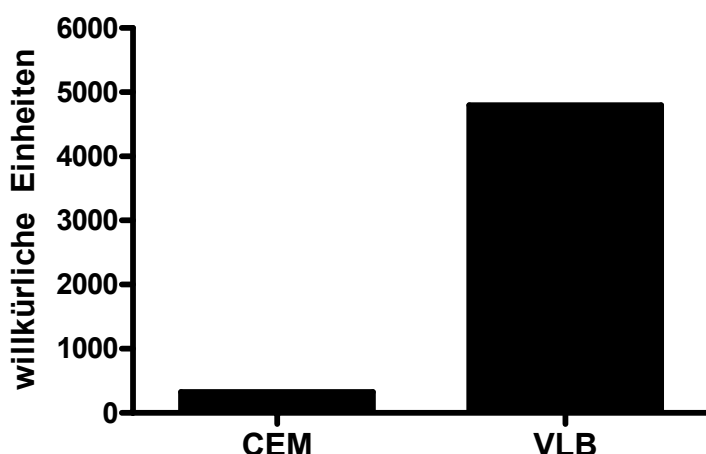


Abb. 3-28: Basale Expression von Pgp in CEM- und VLB-Zellen

*Densitometrische Auswertung des Western Blots von unbehandelten Zellen,  $n = 1, 8$  unabhängige Wiederholungen. Antikörper C19 gegen Pgp.*

Im Folgenden wurden die Zellen mit Johanniskrautextrakt, Hyperforin und Quercetin für 24h behandelt. Diese Substanzen wurden ausgewählt, weil das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung von Johanniskrautextrakt liegen sollte. Hyperforin und Quercetin haben sich in den Untersuchungen zur Modulation der Transportaktivität von Pgp als aktive Substanzen gezeigt, daher sollte auch ihr Einfluß auf die Expression geklärt werden.

### 3.4.1 Johanniskrautextrakt

Nach 24 stündiger Inkubation mit Johanniskrautextrakt zeigte sich, dass der Extrakt die Expression von Pgp in CEM-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle K hochreguliert. In den VLB-Zellen, die auch basal schon sehr viel Pgp exprimieren, ist eine Steigerung der Expression nicht mehr möglich.

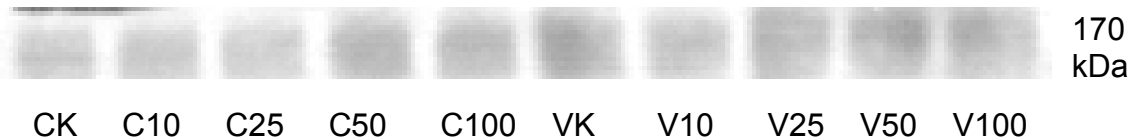


Abb. 3-29: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Johanniskrautbehandlung [ $\mu\text{g/ml}$ ] (C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen)

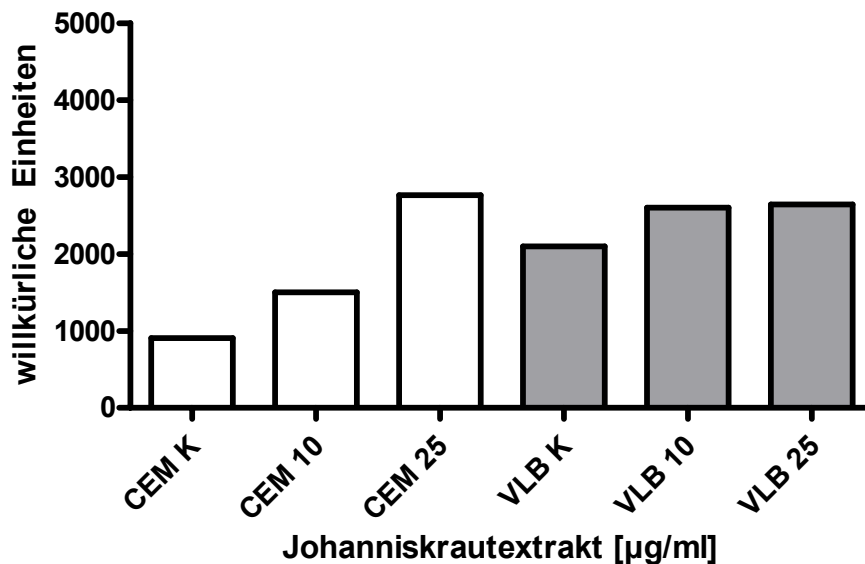


Abb. 3-30: Expression von Pgp nach Behandlung mit Johanniskrautextrakt (Lichtwert)

Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ . Densitometrische Auswertung des Western Blots von behandelten Zellen,  $n = 1$ , zwei Wiederholungen mit gleichem Ergebnis. Antikörper C19 gegen Pgp.

Die in-vitro Versuche zur Expression von Pgp wurden jeweils an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Hier ist ein klarer Trend der Hochregulation erkennbar, der statistisch allerdings nicht signifikant ist.

### 3.4.2 Hyperforin

Hyperforin zeigte nach 24 stündiger Inkubation ebenfalls eine Zunahme der Expression von Pgp an den CEM-Zellen. Diesmal ließ sich auch die Konzentration von Pgp in der Membran von VLB-Zellen durch Behandlung mit Hyperforin steigern. Diese Behandlung wurde wiederum mit einem  $n = 3$  durchgeführt. Auch hier ist die Zunahme der Expression in beiden Zellen sehr deutlich erkennbar.

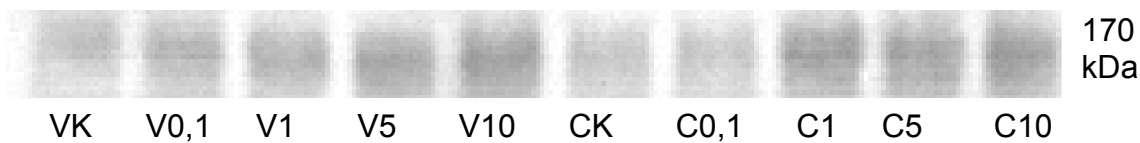


Abb. 3-31: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Behandlung mit Hyperforin [ $\mu\text{M}$ ] (C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen)

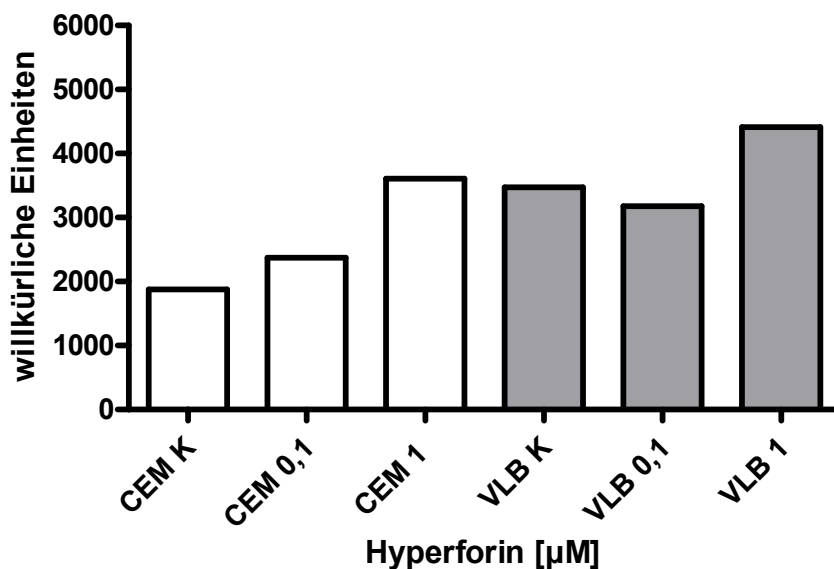


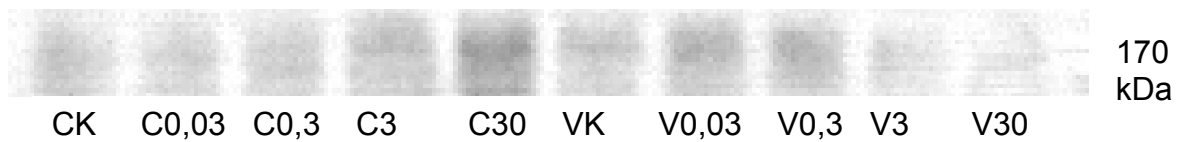
Abb. 3-32: Expression von Pgp nach Behandlung mit Hyperforin

Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ . Densitometrische Auswertung des Western Blots von behandelten Zellen,  $n = 1$ , zwei Wiederholungen mit gleichem Ergebnis. Antikörper C19 gegen Pgp.

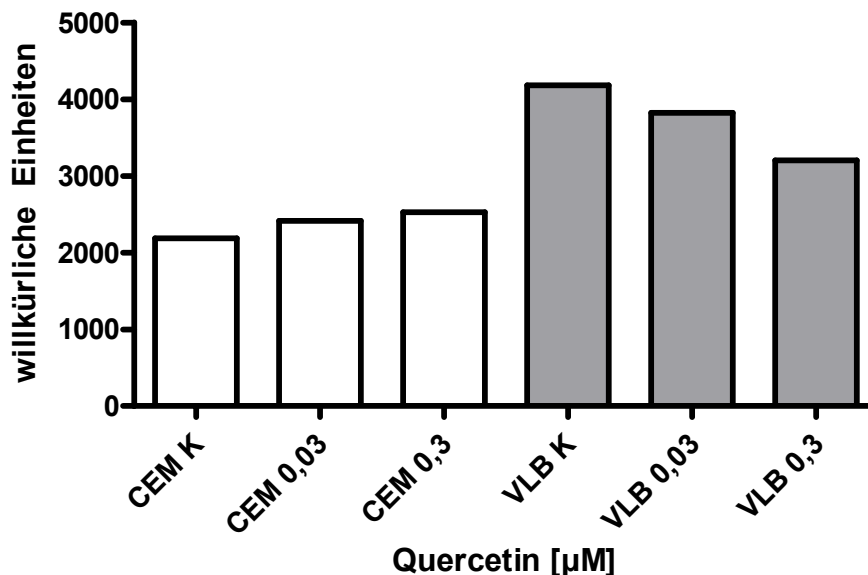


### 3.4.3 Quercetin

Nach 24 stündiger Inkubation der Lymphoblastomzellen mit Quercetin zeigt sich kein Effekt bezüglich der Expression von Pgp in den Lymphoblastomzellen.



**Abb. 3-33: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Behandlung mit Quercetin [ $\mu\text{M}$ ]**  
(C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen)



**Abb. 3-34: Expression von Pgp nach Behandlung mit Quercetin**

Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ . Densitometrische Auswertung des Western Blots von behandelten Zellen,  $n = 1$ , zwei Wiederholungen mit gleichem Ergebnis. Antikörper C19 gegen Pgp. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

In den drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigt sich eindeutig, daß Quercetin keinen Effekt auf die Expression von Pgp hat. Die Abnahme in VLB-Zellen lässt sich wahrscheinlich durch zelltoxische Effekte bei einer Inkubationszeit von 24h erklären.

### **3.5 Ergebnisse der Behandlungsstudien**

Nachdem sich in den zellulären Experimenten gezeigt hatte, dass Johanniskrautextrakt sowie dessen Hauptinhaltsstoffe sowohl Pgp nach kurzer Inkubation hemmen können als auch nach längerer Inkubation induzieren können, wurde im nächsten Schritt geklärt, ob sich die Befunde bezüglich der Expression *in-vivo* im Tiermodell bestätigen lassen.

Ein wesentlicher Teil der Arbeit war die Klärung, ob Johanniskraut und diverse Antidepressiva nicht nur in der Lage sind, den Calcein-AM Transport durch Pgp zu hemmen, sondern ob sie auch die Verteilung von Corticosteron zwischen Plasma und Gehirn der Mäuse – vielleicht über die Hemmung von Pgp – zu verändern vermögen. Ob Corticosteron durch Pgp transportiert wird, wird kontrovers diskutiert. Die Datenlage spricht aber vermehrt dafür, dass Corticosteron ein Substrat von Pgp ist (siehe 1.6). Daher könnten Substanzen, die Pgp hemmen/aktivieren oder induzieren, die Verteilung dieses Glucocorticoids im Körper verändern.

Beide Fragestellungen lassen sich im Tiermodell nach Behandlung mit den entsprechenden Substanzen beantworten. Durch Analyse des Hirnhomogenats der behandelten Mäuse bezüglich der Expression von Pgp wurde die Frage bezüglich der Proteinmenge geklärt und durch Bestimmung der Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn der behandelten Mäuse lies sich eine Aussage zur Verteilung von Corticosteron treffen.

Es wurden daher männliche NMRI Mäuse akut einmal und subchronisch für 14 Tage mit unterschiedlichen Substanzen behandelt. Es wurden 4 verschiedene Antidepressiva aus unterschiedlichen Klassen ausgewählt, die sich in den Untersuchungen bezüglich der Modulation der Transportkapazität von Pgp als aktiv erwiesen haben. Zum einen wurde Johanniskrautextrakt appliziert, zum anderen Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin. Damit waren die Klassen der Tricyclika, SSRIs und Tetracyclika abgedeckt. Am Ende der Behandlung wurde den Tieren Blut entnommen und nach Tötung der Tiere wurde das Gehirn isoliert. Aus beiden Proben wurde der Corticosteronspiegel bestimmt und zusätzlich aus dem Hirnhomogenat die Expression von Pgp mittels Western Blot analysiert.

Es wurden jeweils zwei akute und zwei subchronische Studien durchgeführt. In den ersten beiden Studien wurde der Einfluß von Johanniskrautextrakt und Amitriptylin gegen Vehikel getestet. In den letzten beiden Studien wurden Mirtazapin und Fluoxetin untersucht. Da von beiden zuletzt genannten Stoffen keine Reinsubstanzen vorhanden waren, wurden gemörserte Tabletten/Kapseln eingesetzt. In dieser Studie wurde die unbehandelte Kontrolle mit einer gängigen Placebomischung behandelt um den Einfluß von Hilfsstoffen zu eliminieren.

Im Vergleich der Studien untereinander zeigte sich, dass die in den Tabletten und Kapseln enthaltenen Hilfsstoffe keinen Einfluß auf die gemessenen Parameter haben. Die Kontrollgruppen, die nur mit Vehikel gefüttert wurden, unterscheiden sich nicht von den Kontrollgruppen, die Placebomischung erhalten haben.

Während der subchronischen Studien hat sich der visuell zu beobachtende Zustand (Verhalten, Aussehen) der Mäuse in keiner der behandelten Gruppe verschlechtert. Sie haben die Behandlung mit den jeweiligen Substanzen demnach wohl sehr gut vertragen. Die Gewichtszunahme der Tiere innerhalb dieser 14 Tage ist in Tabelle 3-12 durchschnittlich dargestellt. Die Kontrolltiere haben zwar mehr zugenommen als die behandelten Tiere, aber auch die Gewichtszunahme innerhalb der Behandlungsgruppen liegt in den 2 Wochen innerhalb eines normalen Rahmens. Es ergeben sich keinerlei Unterschiede zwischen der Kontrolle 1, der Johanniskraut- und der Amitriptylin-Gruppe. Zwischen Kontrollgruppe 2, der Fluoxetingruppe und der Mirtazapingrouppe bestehen bezüglich des Gewichts ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

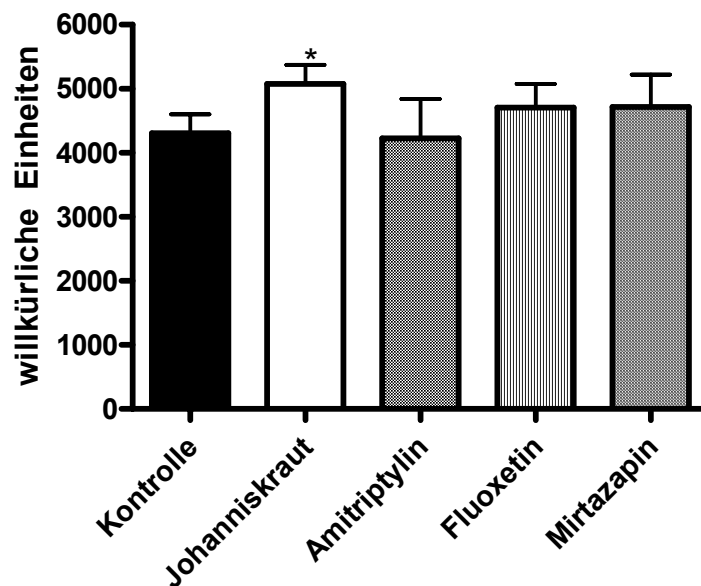
**Tabelle 3-12: Gewichtszunahme der einzelnen Behandlungsgruppen innerhalb der 14 tägigen Behandlung**

Gruppe	Gewichtszunahme	Gruppe	Gewichtszunahme
Kontrolle 1	+ 5,9 ± 0,6 g	Kontrolle 2	+ 2,5 ± 0,7 g
Johanniskraut	+ 4,1 ± 1,0 g	Fluoxetin	+ 1,9 ± 0,9 g
Amitriptylin	+ 5,0 ± 0,8 g	Mirtazapin	+ 2,5 ± 0,7 g

Im Folgenden werden nun die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Als erstes werden die Daten bezüglich der Expression von Pgp gezeigt und im Anschluß die Daten des Corticosteronassays. Am Ende des Kapitels werden die Effekte der einzelnen Substanzen auf die entsprechenden Parameter tabellarisch zusammengefaßt.

### 3.5.1 Expression von P-Glykoprotein

Bezüglich der Expression von Pgp ergaben sich nach akuter Behandlung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen. Da eine Veränderung der Genexpression üblicherweise mehr als 1h Zeit erfordert, waren hier auch keinerlei Veränderungen zu erwarten. Daher soll hier von der graphischen Darstellung abgesehen werden. Nach der 14tägigen Behandlung mit den einzelnen Substanzen ergibt sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Johanniskrautextrakt erhalten hat. Johanniskrautextrakt erhöht in der applizierten Dosis die Expression von Pgp im Gehirnhomogenat mäßig aber signifikant um 25%. Die anderen Substanzen zeigen keinen Einfluß (durchschnittlich: Amitriptylin + 4%, Fluoxetin + 11%, Mirtazapin + 6%) auf die Expression von Pgp. Die Ergebnisse werden in Abb. 3-35 graphisch dargestellt.



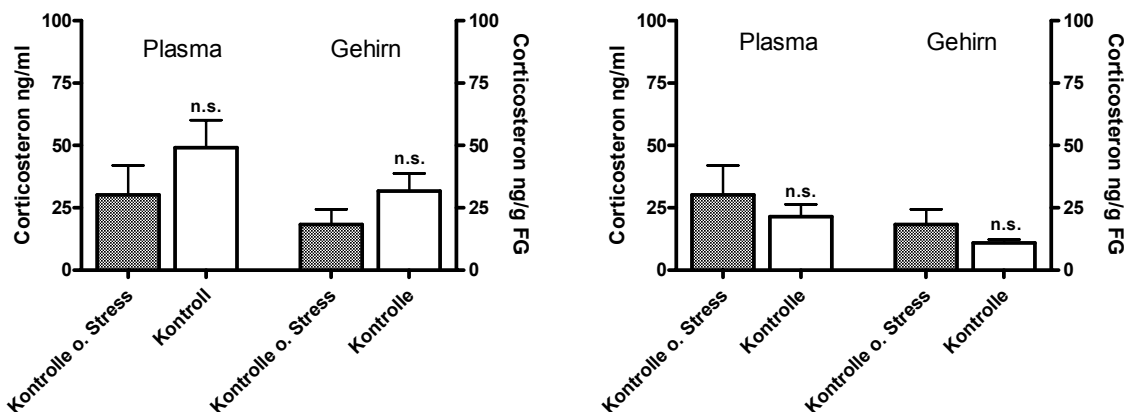
**Abb. 3-35: Expression von Pgp nach subchronischer Behandlung**

Eingesetzte Konzentrationen: Johanniskrautextrakt: 300 mg/kg KG, alle anderen: 10 mg/kg KG. Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Maushirnhomogenat nach Akutbehandlung,  $n = 10$ , one-way-anova mit Bonferroni's multi comparison test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.5.2 Corticosteronspiegel

#### 3.5.2.1 Kontrollgruppen

Als erstes wurde untersucht, ob der Stress durch die Schlundsondierung einen Einfluß auf die Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn der Mäuse hat. Hierfür wurden unbehandelte Tiere (Kontrolle ohne Stress) mit den behandelten Kontrollen verglichen. Sowohl im Plasma als auch im Gehirnhomogenat zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren. Jedoch war - wie zu erwarten - ein leichter Anstieg der Corticosteronspiegel nach akuter Behandlung zu beobachten. Jede Berührung bedeutet Stress für die Tiere, die Schlundsondierung demnach auch, jedoch scheint der Stress nicht so ausgeprägt zu sein, daß er zu einer signifikanten Zunahme des Corticosterons führt. Im Gehirn steigt die Corticosteronkonzentration weniger stark an, das Gleichgewicht zwischen Gehirn und Plasma stellt sich also nicht so schnell wieder ein. Nach subchronischer Studie liegen die Corticosteronkonzentrationen sowohl im Plasma als auch im Gehirn der behandelten Tiere unter denen der akut behandelten.



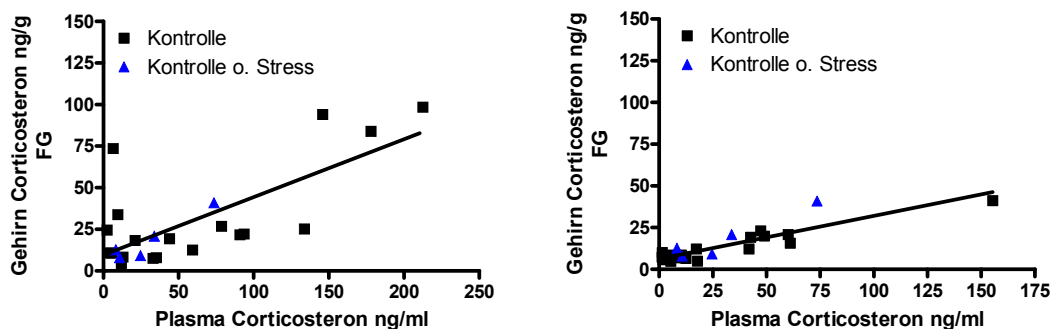
**Abb. 3-36: Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn bei Kontrollen mit und ohne Behandlung**

Links: akute Behandlungskontrolle versus unbehandelte Kontrolle ohne Stress und rechts: subchronische Behandlungskontrolle versus unbehandelte Kontrolle ohne Stress. Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 5$  (Kontrolle ohne Stress) und  $n = 10$  (behandelte Kontrollen); Werte als Duplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test; n.s. = nicht signifikant

Wenn man nun nicht unbehandelte und behandelte Kontrollen miteinander vergleicht, sondern die beiden behandelten – akut und subchronisch – erkennt man, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen einmaliger und

mehrmaliger Behandlung mit Vehikel bzw. Placebo gibt. Leichte Unterschiede sind jedoch wie oben genannt zu erkennen. Während der Plasmaspiegel von Corticosteron nach akuter Behandlung 50 ng/ml beträgt, ist er nach subchronischer Behandlung auf 25 ng/ml abgesunken. Das gleiche Bild zeigt sich bei der gemessenen Konzentration von Corticosteron im Gehirn: nach akuter Studie beträgt sie in der Kontrollgruppe 25ng/g FG und nach 14 Tagen 12,5 ng/g FG. Diese Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen sind jedoch nicht signifikant.

Korreliert man die Plasma- und Gehirnspiegel der Kontrollen (Kontrollen mit und ohne Stress) miteinander ergeben sich jeweils signifikante Korrelationen. Auch hier wird deutlich, dass sich die Kontrollen ohne Stress von denen mit Stress nicht unterscheiden. Die Korrelationen sind Abb. 3-37 graphisch dargestellt. Die Korrelationen ist in beiden Fällen positiv mit Steigungen von  $0,348 \pm 0,07$  (akut) und  $0,258 \pm 0,03$  (subchronisch) und  $r^2$ -Werten von 0,529 (akut) und 0,786 (subchronisch).



**Abb. 3-37: Korrelationen der Plasma- und Gehirnspiegel**

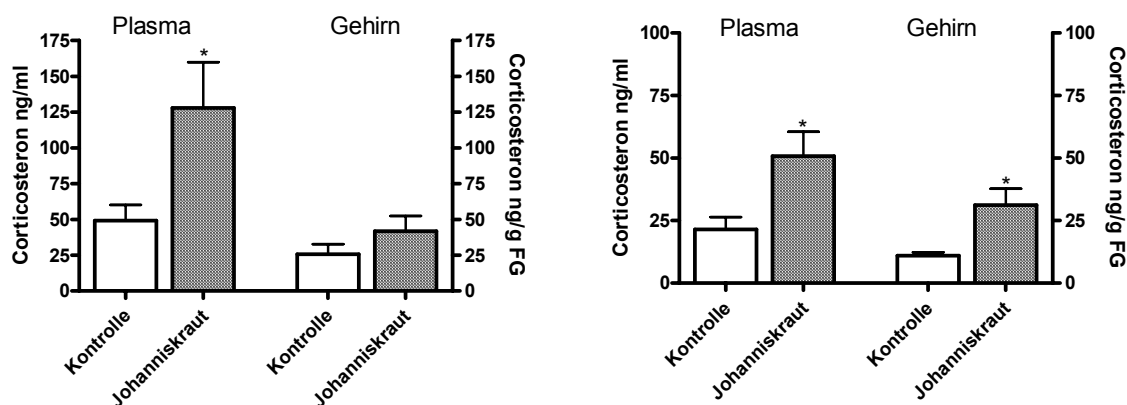
*Links: akute Studie; rechts: subchronische Studie. Dargestellt jeweils die Kontrollen und die Kontrollen ohne Behandlung (ohne Stress). Statistik: lineare Regression der Plasma- und Gehirnwerte. Steigung:  $0,348 \pm 0,07$  (akut),  $0,258 \pm 0,03$  (subchronisch);  $r^2$ : 0,529 (akut), 0,786 (subchronisch)*

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Stress durch die Schlundsondierung keinen Einfluß auf die Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma hat. Die Werte sowohl in Plasma als auch Gehirn sind nach subchronischer Behandlung geringer als nach akuter.

### 3.5.2.2 Behandelte Gruppen

Im Folgenden werden die Daten zum Corticosteronspiegel im Plasma und Gehirn der behandelten Tiere dargestellt.

Johanniskrautextrakt erhöht sowohl nach akuter Einmalgabe wie auch nach subchronischer Applikation die Konzentration von Corticosteron im Plasma und im Gehirn. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-38 graphisch dargestellt. Die relativ starke Erhöhung im Plasma nach akuter Gabe spiegelt sich im Gehirn noch nicht so ausgeprägt wieder. Nach subchronischer Gabe ist die Erhöhung in Hirn und Plasma jedoch nahezu gleich.

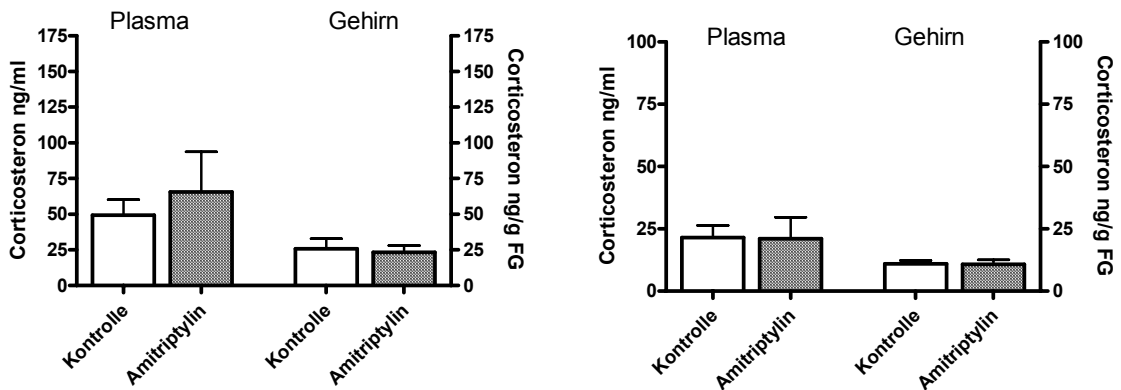


**Abb. 3-38: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Johanniskraut**

Links: akute Behandlung und rechts: subchronische Behandlung. Eingesetzte Konzentrationen akut 500 mg/kg KG und subchronisch 300 mg/kg KG. Mittelwert  $\pm$  SEM  $n = 10$ ; Werte als Duplikate bestimmt. Statistik: t-test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



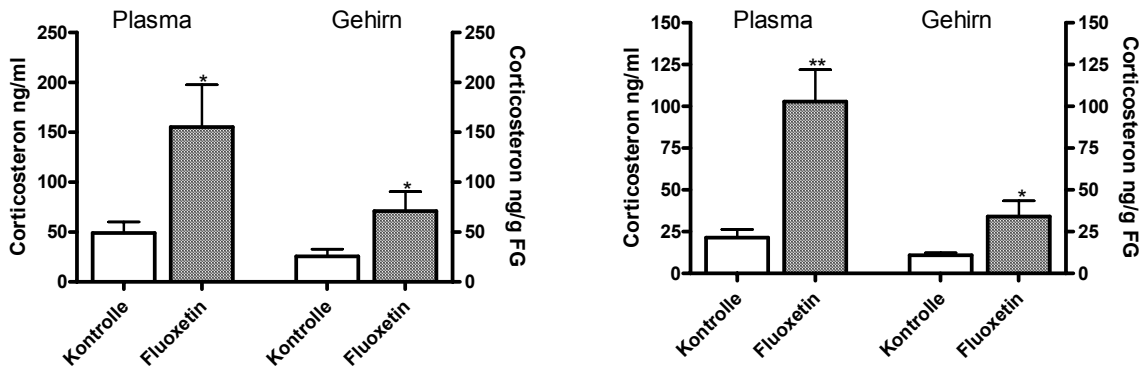
Ein anderes Bild ergibt sich nach den Behandlungen mit Amitriptylin. Dieses tricyclische Antidepressivum hat nämlich weder nach akuter einmaliger Applikation noch nach 14tägiger subchronischer Gabe einen Effekt auf den Corticosteronspiegel. Weder im Gehirnhomogenat noch im Plasma zeigen sich Unterschiede zur Kontrolle. Die graphische Darstellung in Abb. 3-39 zeigt deutlich, dass die Werte auf dem Niveau der Kontrollen liegen.



**Abb. 3-39: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Amitriptylin**

*Links: akute Behandlung und rechts: subchronische Behandlung. Eingesetzte Konzentration akut und subchronisch 10 mg/kg KG. Mittelwert  $\pm$  SEM  $n = 10$ ; Werte als Duplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .*

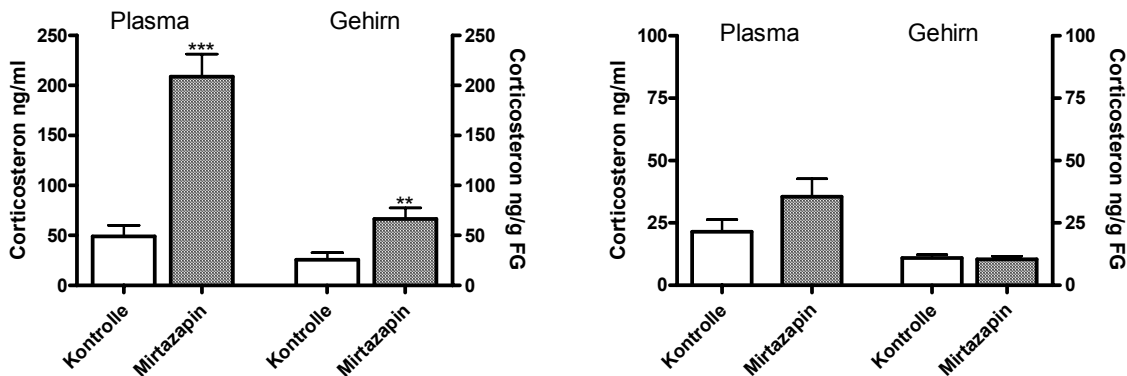
Nach der Behandlung mit Fluoxetin zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach der Behandlung mit Johanniskrautextrakt. Die graphische Darstellung ist in Abb. 3-40 zu sehen. Akut erhöht dieser selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer den Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma der Tiere. Hier ist jedoch die Erhöhung von Corticosteron nach akuter Gabe im Gehirn ebenfalls schon wie im Plasma signifikant. Nach subchronischer Behandlung ist diese Erhöhung ebenfalls noch vorhanden und sogar etwas stärker ausgeprägt.



**Abb. 3-40: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Fluoxetin**

Links: akute Behandlung und rechts: subchronische Behandlung. Eingesetzte Konzentration akut und subchronisch 10 mg/kg KG. Mittelwert  $\pm$  SEM  $n = 10$ ; Werte als Duplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Mirtazapin hat wiederum einen anderen Effekt auf die Corticosteronspiegel. Diese Substanz erhöht nach akuter Einmalgabe die Konzentration von Corticosteron in Plasma und Gehirn hoch signifikant. Nach der subchronischen Gabe ist diese Erhöhung allerdings nicht mehr vorhanden. Nach 14tägiger Applikation von Mirtazapin befinden sich die Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn auf dem Niveau der Kontrolle. Die Daten bezüglich Mirtazapin sind in Abb. 3-41 graphisch dargestellt.



**Abb. 3-41: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Mirtazapin**

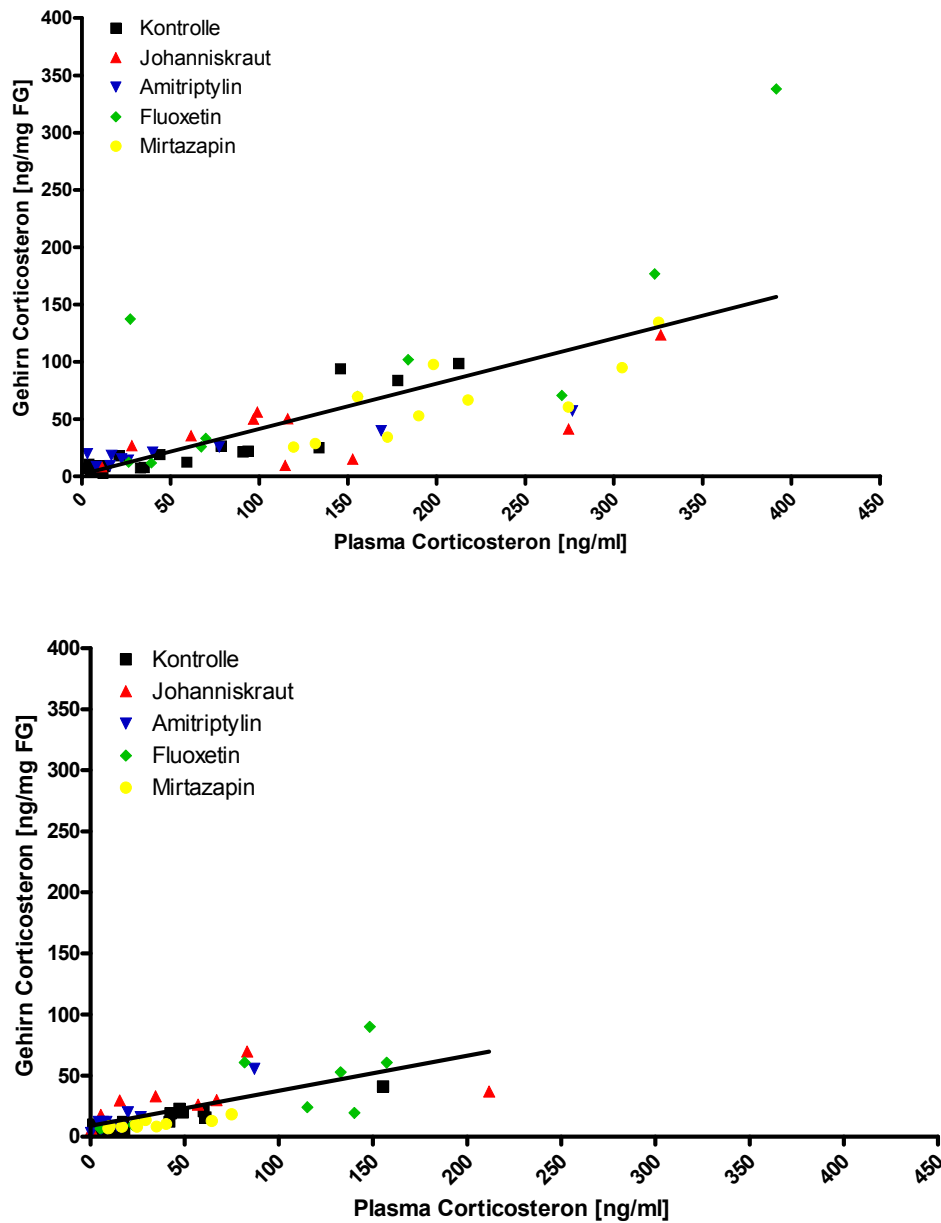
Links: akute Behandlung und rechts: subchronische Behandlung. Eingesetzte Konzentration akut und subchronisch 10 mg/kg KG. Mittelwert  $\pm$  SEM  $n = 10$ ; Werte als Duplikate bestimmt. Statistik:  $t$ -test gegen unbehandelte Kontrolle, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Alle 4 Substanzen haben unterschiedliche Effekt auf die gemessenen Corticosteronspiegel. Amitriptylin hat keinen Effekt, Johanniskrautextrakt und Fluoxetin haben ähnliche Effekt und erhöhen beide sowohl nach akuter als auch nach subchronischer Gabe die Konzentration von Corticosteron in Plasma und Gehirn. Mirtazapin hingegen erhöht akut beide Spiegel hochsignifikant, hat nach subchronischer Gabe jedoch keinen Einfluß mehr auf die Konzentration von Corticosteron.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass keine der applizierten Substanzen zu einer Veränderung der Verteilung von Corticosteron zwischen Gehirn und Plasma führt. In keiner der behandelten Gruppen ist eine Anreicherung von Corticosteron im Plasma oder im Gehirn zu erkennen. Korreliert man in den einzelnen Gruppen die Plasma mit den Gehirnwerten ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der Korrelation der Kontrolle, die in Abb. 3-37 gezeigt ist. Die Konzentration von Corticosteron im Gehirn ist unter allen Bedingungen eine lineare Funktion der Plasmaspiegel. Die Steigungen der einzelnen Korrelationen sind in Tabelle 3-13 genannt. Alle Korrelationen sind signifikant. Die Gesamtkorrelationen, wenn man alle Gruppen zusammenfasst, sind für die akute und für die subchronische Gabe in Abb. 3-42 gezeigt.

**Tabelle 3-13: Steigungen der einzelnen linearen Regressionen der Behandlungsgruppen nach akuter und subchronischer Behandlung**

Gruppe	akut	subchronisch
Kontrolle	0,423 ± 0,05	0,2402 ± 0,03
Johanniskraut	0,228 ± 0,09	0,220 ± 0,08
Amitriptylin	0,163 ± 0,01	0,572 ± 0,06
Fluoxetin	0,593 ± 0,17	0,351 ± 0,11
Mirtazapin	0,389 ± 0,1	0,135 ± 0,03



**Abb. 3-42: Gesamtkorrelationen nach akuter (oben) und subchronischer (unten) Applikation**

Applikation von Johanniskrautextrakt, Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin in o.g. Konzentrationen. Statistik: lineare Korrelation der Plasma- und Gehirnwerte: Steigung:  $0,396 \pm 0,05$  (akut),  $0,2869 \pm 0,05$  (subchronisch);  $r^2$ :  $0,5619$  (akut),  $0,3708$  (subchronisch),  $p < 0,0001$  (beide).

### 3.5.3 Tabellarische Zusammenfassung

Amitriptylin ist das Antidepressivum mit den geringsten Effekten auf die untersuchten Parameter. Weder nach akuter noch nach subchronischer Behandlung zeigen sich signifikante Effekte.

**Tabelle 3-14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Amitriptylin**

Behandlungs- dauer	Expression	Corticosteron Plasma	Corticosteron Gehirn
akut	-	-	-
subchronisch	-	-	-

Fluoxetin als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer erhöht akut die Konzentration von Corticosteron sowohl im Gehirnhomogenat als auch im Plasma. Auch nach subchronischer Applikation erhöht es den Corticosteronspiegel im Plasma und im Gehirn. Auf die Expression von Pgp im Hirn hat es nach 14tägiger Gabe keinen Einfluß.

**Tabelle 3-15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Fluoxetin**

Behandlungs- dauer	Expression	Corticosteron Plasma	Corticosteron Gehirn
akut	-	*	*
subchronisch	-	**	*

Bei Johanniskrautextrakt zeigt sich ein ähnliches, jedoch leicht anderes Bild. Nach akuter Einmalgabe erhöht dieser Extrakt die Konzentration von Corticosteron im Plasma. Im Gehirn ist diese Erhöhung tendentiell auch zu erkennen, jedoch nicht signifikant. Nach subchronischer Gabe ist die Erhöhung von Corticosteron sowohl im Plasma als auch im Gehirn signifikant. Nach subchronischer Gabe erhöht die Gabe des Extraktes ebenfalls die Expression von Pgp im Hirnhomogenat.

**Tabelle 3-16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Johanniskrautextrakt**

Behandlungs- dauer	Expression	Corticosteron Plasma	Corticosteron Gehirn
akut	-	*	-
subchronisch	*	*	*

Mirtazapin zeigt nur nach akuter Gabe signifikante Effekte auf den Corticosteronspiegel. Es erhöht nach einmaliger Applikation sowohl die Konzentration von Corticosteron im Gehirn als auch im Plasma. Nach subchronischer Applikation ist diese Erhöhung nicht mehr zu erkennen und die Werte bewegen sich auf dem Niveau der Kontrolle. Auf die Expression von Pgp zeigt Mirtazapin weder nach akuter noch nach subchronischer Gabe einen Effekt.

**Tabelle 3-17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Mirtazapin**

Behandlungs- dauer	Expression	Corticosteron Plasma	Corticosteron Gehirn
akut	-	***	**
subchronisch	-	-	-

Keine der vier untersuchten Substanzen verändert die Verteilung von Corticosteron zwischen Plasma und Gehirn. Dieses zeigt sich sehr deutlich in den Korrelationen der Plasma- und Gehirnspiegel.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Antidepressiva einen Teil ihrer Wirkung durch Modulation der HPA-Achse entfalten. Pariante et al. stellten die Hypothese auf, dass Antidepressiva unterschiedlicher Klassen und biochemischer Wirkung membranständige Glucocorticoid-Transporter – vor allem Pgp – hemmen und es dadurch zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Glucocorticoiden (Cortisol im Menschen und Corticosteron im Nager) kommt. Dadurch kann es zu einer verstärkten Glucocorticoid-vermittelten Gentranskription kommen, der negative Feedback der HPA-Achse wird verbessert und die Hyperaktivität der Achse wird damit normalisiert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Punkte dieser Theorie mit unterschiedlichen Antidepressiva untersucht. Zum einen wurde untersucht, ob Glucocorticoide überhaupt mit Pgp interagieren und dessen Transportaktivität modulieren können. Weitergehend wurde untersucht, ob Antidepressiva Pgp zu inhibieren vermögen und ob sie in der Lage sind, die Verteilung von Glucocorticoiden zwischen Plasma und Gewebe (Gehirn) zu verändern. Da es durch eine veränderte Expression von Pgp – genau wie durch Modulation der Transportaktivität – ebenfalls zu veränderten Verteilungen von dessen Substraten zwischen verschiedenen Kompartimenten kommen kann, wurde des Weiteren untersucht, ob Antidepressiva die Expression von Pgp verändern können.

Da verschiedene Zellsysteme Unterschiede in ihren Membranzusammensetzungen aufweisen, wurden die Glucocorticoide und Antidepressiva in zwei Zellsystemen bezüglich der Modulation von Pgp untersucht. Diese Unterschiede können die Substratspezifität von Pgp beeinflussen. Außerdem kann die Expressionsdichte von Pgp in verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich sein. Die Lymphoblastomzellen repräsentieren ein Modell für das humane Pgp, die Schweinehirn Kapillarendothelzellen hingegen stellen ein Modell für die BBB dar.

Bezogen auf die Lymphoblastomzellen wurden alle Substanzen nicht nur in VLB-Zellen (+ Pgp), sondern auch in CEM-Zellen (- Pgp) getestet. Es ließ sich in den CEM-Zellen kein Einfluß der getesteten Stoffe auf die Calcein-Fluoreszenz erkennen. Dies zeigt an, dass die Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz in VLB-Zellen definitiv durch die Hemmung von Pgp entsteht, denn der einzige Unterschied der CEM- und VLB-Zellen besteht in der Expressionsdichte von Pgp.

Um einen Einfluß von Mrp-1 und Mrp-2 auszuschließen wurde der Mrp-1 und Mrp-2 Inhibitor Probenecid ebenfalls an den in dieser Arbeit verwendeten Zellen getestet. Dieser hatte keinen Effekt auf die intrazelluläre Fluoreszenz. Daraus lässt sich schließen, dass die gezeigten Effekte durch Modulation von Pgp entstehen und keine Modulation von Mrp1 und/oder Mrp-2 eine Rolle spielt. Dies wurde ebenfalls von Weiss et al. in anderen Zellsystemen nachgewiesen

<sup>74</sup>.

Die unterschiedlichen benötigten Konzentrationen, um in beiden Zellsystemen eine Hemmung hervorzurufen, lassen sich durch die oben genannten Gründen erklären: zum einen wird Pgp in verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich stark exprimiert und zum anderen kann es auf Grund unterschiedlicher Membranzusammensetzung eine leicht unterschiedliche Substratspezifität aufweisen.



#### **4.1 Glucocorticoide**

Um zu klären, ob Glucocorticoide überhaupt mit Pgp interagieren können, wurde untersucht, ob Cortisol, Corticosteron und Progesteron die Transportkapazität von Pgp modulieren können. Die drei untersuchten Glucocorticoide hemmen Pgp alle in unterschiedlichem Ausmaß. Cortisol ist das am wenigsten potente Glucocorticoid bezüglich der Hemmung von Pgp (signifikant 100 µM VLB und PBCEC). Corticosteron (signifikant > 30 µM (VLB), 100 µM (PBCEC)) inhibiert Pgp in etwas stärkerem Ausmaß und auch in geringeren Konzentrationen als Cortisol. Progesteron ist von den drei untersuchten Glucocorticoiden die potenteste Verbindung (signifikant > 30 µM (VLB), > 1 µM (PBCEC)). Es hemmt in PBCEC-Zellen schon in geringen Konzentrationen. Die Hemmung ist in hohen Konzentrationen stark ausgeprägt. Es lässt sich also bezüglich der Potenz in der Hemmung von Pgp folgende Reihenfolge aufstellen:

Cortisol < Corticosteron < Progesteron

Diese Daten werden durch die Daten anderer Arbeitsgruppen gestützt. Van Kalken et al. konnten zeigen, dass Cortisol und Progesteron den Transport von Daunorubicin durch Pgp verringern. Und zwar gehört Progesteron zu den Substanzen mit starken Effekten und Cortisol zeigt eher schwache Effekte<sup>58</sup>. In Versuchen mit Vinblastin als Substrat von Pgp akkumuliert das Substrat in Gegenwart von Progesteron sehr stark, in Gegenwart von Corticosteron leicht und in Gegenwart von Cortisol nicht in Membranvesikeln<sup>76</sup>. Also zeigt sich auch hier, dass Progesteron ein starker Pgp Modulator ist, Corticosteron mittelstark und Cortisol allenfalls ein schwacher Modulator ist. Barnes et al. kommen in einem anderen Zellsystem zu ähnlichen Ergebnissen<sup>56</sup>. In einem weiteren Pgp überexprimierenden Zellsystem ist Progesteron ebenfalls in der Lage Pgp zu inhibieren und zwar ähnlich stark wie Chinidin, ein bekannter starker Pgp-Modulator<sup>77</sup>.

Die Frage ob Glucocorticoide durch Pgp transportiert werden, wurde anhand von Literaturdaten in der Einleitung unter 1.6 ausführlich diskutiert. Cortisol und Corticosteron werden wohl über Pgp aus Zellen hinaus transportiert – daher wird die Hemmung des Transporters durch diese zwei Substanzen kompetitiv sein. Die Datenlage zu Progesteron ist so kontrovers, dass man sich nicht festlegen kann, ob es wohl transportiert wird und somit kompetitiv inhibiert oder ob es nicht transportiert wird und die Hemmung daher allosterischer Natur ist.

Bezüglich der Modulation der Transportaktivität von Pgp ist die Datenlage recht einheitlich und wird durch die Daten dieser Arbeit gestützt.

#### ***4.2 Modulation der Transportaktivität von P-Glykoprotein und daraus resultierende mögliche antidepressive Wirkung***

Eine Inhibition der Transportaktivität von Pgp soll wie in der Hypothese nach Pariante et al. zur Wirksamkeit antidepressiver Substanzen beitragen <sup>17,78</sup>. Durch Hemmung des Auswärtstranportes endogener Glucocorticoide soll es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration dieser Corticoide kommen. Durch verstärkte Aktivierung des MR und GR könnte dann die Funktion der HPA-Achse normalisiert werden. Der gestörte Feedback-Mechanismus wäre dadurch normalisiert <sup>79</sup>.

Neben dieser wichtigen wirkungsmittelbestimmenden Komponente durch Inhibition von Pgp gibt es aber noch weitere Folgen einer Modulation der Aktivität von Pgp. Pgp wird unter anderem an der BBB und im Gastro-Intestinal-Trakt exprimiert. An der BBB ist es in der apikalen Membran der Kapillarendothelzellen lokalisiert und transportiert Substrate zurück in den Blutkreislauf <sup>26,80</sup>. Somit limitiert Pgp den Eintritt von Substanzen ins ZNS und moduliert die Effektivität und ZNS-Toxizität vieler Stoffe <sup>74</sup>. Im GI-Trakt transportiert Pgp Substanzen zurück ins Darmlumen und mindert so die Bioverfügbarkeit oral verabreichter Stoffe <sup>81</sup>. Es kann aber auch eine Modulation von Pgp durch coapplizierte Substanzen zu veränderten Plasmaspiegeln führen. Als Modulation kann hier neben einer veränderten Expression auch eine Hemmung oder Aktivierung von Pgp wichtig sein. Zusammenfassend lässt sich

sagen, dass eine Inhibition/Aktivierung oder Induktion von Pgp an zahlreichen Arzneimittelinteraktionen beteiligt sein kann <sup>82-85</sup>.

Daher soll in diesem Abschnitt nicht nur die potentielle antidepressive Wirksamkeit über Hemmung von Pgp diskutiert werden, sondern ebenfalls auf das Interaktionspotential der untersuchten Substanzen eingegangen werden.

#### **4.2.1 Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe**

##### **4.2.1.1 Extrakt, Hyperforin und Hypericin**

Eine Einzelgabe von Johanniskrautextrakt führt in beiden untersuchten Zellsystemen zu einer Hemmung der Transportkapazität von Pgp. Der Extrakt hemmt in hohen Konzentrationen (100 µg/ml) in VLB-Zellen signifikant und in geringeren Konzentrationen (5 µg/ml, 10 µg/ml und 25 µg/ml) in PBCEC-Zellen signifikant. Die Konzentrationen, die benötigt werden um Pgp zu hemmen, sind wesentlich größer als die Konzentrationen des gleichen Extraktes, die den neuronalen Uptake von Neurotransmittern hemmen. Johanniskraut inhibiert wie einleitend erwähnt den Reuptake zahlreicher Neurotransmitter, allerdings findet diese Inhibition in Konzentrationen von rund 2 µg/ml statt <sup>6,86</sup>. Betrachtet man die Plasmakonzentrationen, die man nach oraler Applikation von Johanniskrautextrakt erreicht, wird deutlich, dass die Hemmung von Pgp keine physiologische Relevanz besitzen kann. Nach Gabe einer einzelnen Dosis von 300 mg/kg KG Johanniskrautextrakt erreicht man Plasmaspiegel von 280 nM Hyperforin. Nach chronischer Applikation von 3 x 300 mg/kg KG Johanniskrautextrakt pro Tag erzielt man Steady-state Konzentrationen von Hyperforin um 180 nM <sup>87</sup>. Die im Gehirn gemessenen Konzentrationen sind noch wesentlich geringer: nach Applikation einer therapeutisch relevanten Dosis von Johanniskrautextrakt (300 mg/kg KG) erreicht man Hyperforin-Spiegel von 15,8 ng/g Gehirngewebe <sup>88</sup>.

Dass nicht nur der Extrakt, sondern auch einige der Hauptinhaltsstoffe wie Hyperforin und Hypericin Pgp teils in beiden Zellsystemen inhibieren, konnte in dieser Arbeit ebenfalls zweifelsfrei gezeigt werden. Hyperforin hemmt sowohl in PBCEC-Zellen als auch in den Lymphoblastomzellen die Transportaktivität von Pgp konzentrationsabhängig. Hyperforin ist eine der wenigen Substanzen, mit denen innerhalb dieser Arbeit eine EC50 bestimmt werden konnte. Diese EC50 beträgt in VLB-Zellen 14,8  $\mu\text{M}$  und in PBCEC-Zellen 1,1  $\mu\text{M}$  und liegt damit wesentlich über den im Körper nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen von Johanniskrautextrakt erzielten Konzentrationen (siehe oben). Die Inhibition von Pgp durch den untersuchten Extrakt, Hyperforin und Hypericin könnte potentiell wichtig sein für die intestinale Resorption coapplizierter Substanzen, denn im G.I.-Trakt werden nach oraler Applikation Konzentrationen, die Pgp zu hemmen vermögen, erreicht. Für die ZNS-Bioverfügbarkeit von Substraten von Pgp haben der Extrakt und die hier genannten Inhaltsstoffe keinerlei Bedeutung, denn die Konzentrationen, die für eine Hemmung von Pgp benötigt werden liegen weit über den im Plasma erreichten Konzentrationen - selbst nach chronischer Applikation therapeutisch relevanter Dosen.

Dies ist auch der Grund dafür, dass die Hemmung von Pgp durch Johanniskrautextrakt, Hyperforin und Hypericin nicht zur erwiesenen antidepressiven Wirksamkeit des Extraktes beitragen wird. Um Pgp an der BBB zu hemmen und somit durch intrazelluläre Akkumulation von Glucocorticoiden eine Normalisierung der Funktion der HPA-Achse zu erzielen, bräuchte man wesentlich höhere Plasmaspiegel. Diese müssten im unteren micromolaren Bereich für Hyperforin liegen. Solche Konzentrationen lassen sich allerdings mit der Gabe therapeutischer und nicht-toxischer Dosen des Extraktes nicht erreichen.

Wang et al. kamen 2004 an Pgp-überexprimierenden Zellen (NIH3T3-G185) ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Hyperforin (EC50  $30,7 \pm 12,4 \mu\text{M}$ ), Pseudohypericin ( $>10 \mu\text{M}$ ) und Hypericin ( $> 10 \mu\text{M}$ ) Pgp inhibieren<sup>89</sup>. Die Ergebnisse bezüglich Hyperforin stimmen also mit denen dieser Arbeit überein. Mit Hypericin wurden jedoch unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Das könnte an den unterschiedlichen Zellsystemen liegen, die in den Versuchen verwendet

wurden. Denn auch im Vergleich der PBCEC- und der VLB-Zellen lässt sich bezüglich Hypericin keine eindeutige Aussage über die Hemmung von Pgp treffen.

#### **4.2.1.2 Flavonoide**

Die Wirkung der Flavonoide auf die Transportaktivität von Pgp scheint sowohl vom Zellsystem als auch vom Effluxsubstrat abhängig zu sein. Die drei Flavonoide Quercetin, Galangin und Kaempferol stimulieren den Efflux von zwei verschiedenen Pgp-Substraten in multidrug resistenten Zellen und erhöhen in den Zellen deren Adriamycin-Resistenz <sup>90</sup>. Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass Quercetin die Adriamycin-Resistenz in multidrug resistenten Zellen inhibiert, also dessen Effekt vergrößert und den Efflux von Rhodamin 123, einem Substrat von Pgp, ebenfalls hemmt <sup>91</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Quercetin die ATPase Aktivität von Pgp inhibiert <sup>92</sup>. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich zum einen damit erklären, dass Pgp diverse unterschiedliche Bindungsstellen für Flavonoide besitzt. Eine andere Erklärung bezieht sich auf die Unterschiede der verwendeten Zellsysteme.

Johanniskrautextrakt enthält viele verschiedene Flavonoide, wie z. B. Quercetin, Biapigenin, Amentoflavon, Rutin und Hyperosid. Die meisten der getesteten Flavonoide inhibieren die Transportaktivität von Pgp in höheren Konzentrationen. Eine sehr interessante Substanz bezüglich der Modulation der Pgp-Aktivität ist Quercetin. Dieses Flavonoid weist nämlich einen biphasischen Effekt auf. In niedrigen Konzentrationen (10 nM) aktiviert es die Transportaktivität von Pgp und in höheren Konzentrationen (1 µM) inhibiert es diese. Dieser Effekt wurde schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. Mitsunaga et al. kamen zu dem Ergebnis, dass 10 µM Quercetin den Transport von 3H-Vincristin aktiviert und die intrazelluläre Akkumulation dieses Substrates somit hemmt, während 50 µM Quercetin den Transport hemmen <sup>93</sup>. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass 100 nM Pgp aktivierend wirken und 25 µM Quercetin Pgp hemmen <sup>94</sup>. Aktuell zeigte die Arbeitsgruppe um Limtrakul, dass Quercetin in der Lage ist die Sensitivität von MDR-Zellen für Cytostatika zu erhöhen <sup>95</sup>. Die unterschiedlichen Konzentrationen, welche für die Aktivierung

und Hemmung benötigt werden, lassen sich durch die unterschiedlichen verwendeten Zellsysteme erklären. Der Efflux von Pgp Substraten wird direkt aktiviert als ein Ergebnis von erhöhter Phosphorylierung von Pgp bei niedrigen Quercetin-Konzentrationen. Die Hemmung von Pgp ist ebenfalls ein direkter Effekt am Transportprotein selbst <sup>93</sup>. Pharmakokinetische Studien mit Nahrungsmitteln, die Quercetin enthalten, zeigen, dass die erreichten Plasmakonzentrationen nicht höher als ungefähr 1µM/l sind <sup>96</sup>. Dies legt nahe, dass die Aktivierung von Pgp eine physiologische Rolle spielen kann, während die Hemmung erst bei hohen Konzentrationen, die im Plasma nicht erreicht werden, stattfindet.

Bezüglich der eigentlichen Fragestellung, nämlich ob eine eventuelle Hemmung von Pgp durch die Substanzen eine antidepressive Wirksamkeit haben kann, lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die Konzentrationen der Flavonoide, die in der Lage sind Pgp zu hemmen, viel zu hoch sind, als das sie durch Hemmung von Pgp zu einer intrazellulären Akkumulation von Glucocorticoiden führen und damit eine Normalisierung der Funktion der HPA-Achse bewirken könnten. Die beobachtete Aktivierung der Transportaktivität von Pgp bei niedrigen Konzentrationen durch Quercetin bewirkt genau das Gegenteil, so daß noch mehr Glucocorticoide aus dem Inneren der Zelle ins umgebende Medium transportiert werden. Das bedeutet, dass der negative Feedbackmechanismus der HPA-Achse verschlechtert würde. Somit kann Quercetin über diesen Mechanismus folglich keine antidepressive Wirksamkeit entfalten.

#### **4.2.1.3 Zusammenfassung**

Zusammenfassend kann man sagen, dass Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe die Transportaktivität von Pgp in hohen Konzentrationen hemmen. Für die meisten untersuchten Komponenten sowie für den Extrakt selbst kann diese Hemmung einen Effekt auf die Resorption anderer Substanzen im Magen-Darm-Trakt haben, jedoch nicht an der BBB zu Interaktionen führen. Denn die Hemmung von Pgp wird erst bei Konzentrationen (micromolarer Bereich) erzielt, die so hoch sind, daß sie nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen (nanomolarer Bereich) im Plasma

nicht erreicht werden. Quercetin ist der potenteste Inhaltsstoff bezüglich der Modulation der Transportaktivität von Pgp. Die Aktivierung von Pgp könnte physiologische eine Rolle spielen, da sie in sehr niedrigen Konzentrationen stattfindet. Die Hemmung des Gesamtextraktes lässt sich nicht durch die Hemmung eines einzelnen Inhaltsstoffes erklären. Vielmehr ist es so, daß sich der inhibierende Effekt von Hyperforin beispielsweise durch den aktivierenden Effekt von Quercetin *in-vivo* aufheben könnte. Die bei diesen Substanzen gemessene Inhibition von Pgp kann nicht durch Akkumulation von Glucocorticoiden wie Cortisol beim Menschen und Corticosteron beim Nager zu einer Normalisierung des Feedbackmechanismus der HPA-Achse beitragen und somit auf diese Art und Weise auch keine antidepressive Wirkung erzielen.

#### **4.2.2 Andere Antidepressiva**

Es gab in der letzten Zeit vermehrt Hinweise darauf, dass verschiedene Antidepressiva und auch Antipsychotika in der Lage sind aktive Transportprozesse zu hemmen und/oder Substrate dieser Transporter – vor allem Pgp – sein können<sup>97-99</sup>. Allerdings gab es noch keine genauen Studien darüber welche Antidepressiva genau mit Pgp interagieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Antidepressiva aus verschiedenen Klassen untersucht.

Die meisten der getesteten antidepressiven Substanzen inhibieren die Transportfunktion von Pgp in höheren Konzentrationen in unterschiedlichem Ausmaß in VLB-Zellen und PBCEC-Zellen. Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden für die unterschiedlichen Substanzklassen getrennt diskutiert.

##### **4.2.2.1 Tricyclika**

Betrachtet man die untersuchten tricyclischen Antidepressiva kann man sagen, dass alle Pgp in konzentrationsabhängiger Art und Weise hemmen. Clomipramin hat sich in dieser Arbeit in beiden Zellsystemen als potentester Pgp Inhibitor unter den Tricyclika gezeigt. Zu Clomipramin gibt es allerdings nicht sehr viele Daten in der Literatur. Pariente et al. fanden 2001, dass Clomipramin und andere antidepressiv wirksame Substanzen die GR-vermittelte Gentranskription in Gegenwart von Dexamethason erhöhen. Da sich dieser Effekt mit Verapamil völlig blocken lässt, schließen sie, dass

Clomipramin membranständige Glucocorticoid-Transporter wie Pgp blockt und daher die intrazelluläre Konzentration von Glucocorticoiden erhöht <sup>17</sup>. Diese Aussage lässt sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit bei hohen Clomipramin-Konzentrationen bestätigen. Im Vergleich zu Amitriptylin ist Clomipramin auch in den Versuchen der Gruppe um Pariente wesentlich potenter. Des Weiteren testete die Gruppe Paroxetin, Fluoxetin und Citalopram. Auch im Vergleich dieser Antidepressiva unterschiedlicher Klassen ist Clomipramin die potenteste Substanz. Schaut man sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an, kann man die Aussage bestätigen. Nur die getesteten Antipsychotika hemmen Pgp in einem ähnlichen Ausmaß wie Clomipramin. Alle anderen Antidepressiva sind weniger starke Inhibitoren.

Aber auch zu Amitriptylin gibt es in der Literatur Daten, die zeigen, dass es sich um einen potenten Modulator von Pgp handelt. Es ist in der Lage die multidrug resistance von einer Kolonkarzinomzell-Linie aufzuheben und verkleinert in diesen Zellen den Rhodamin 123 Efflux <sup>100</sup>. Auch die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Amitriptylin in beiden verwendeten Zellsystemen in höheren Konzentrationen signifikant Pgp hemmt. Amitriptylin ist aber nicht nur ein Inhibitor von Pgp, sondern ebenfalls Substrat für den Transporter. Die Hemmung scheint also kompetitiver Art zu sein. Es kann demnach bei der Applikation von Amitriptylin zusammen mit anderen Substanzen zu vielfältigen pharmakokinetischen Interaktionen - u.a. über Pgp – kommen. John et al. zeigten, dass Komedikation von Amitriptylin mit Johanniskrautextrakt die AUC von Amitriptylin verkleinert. Dies kann durch eine Induktion der Expression von Cytochromen und Pgp durch den Extrakt erklärt werden <sup>101</sup> und daher gesteigerten Metabolismus und/oder verringerter Absorption von Amitriptylin. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Penetration von Amitriptylin und dessen Hydroxymetaboliten ins ZNS in der Abwesenheit von Pgp in Knockout-Mäusen wesentlich größer ist als in Kontrolltieren nach einmaliger Gabe <sup>98</sup>. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Amitriptylin ein Substrat von Pgp ist. Eine nachfolgende Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte die Ergebnisse für die Hydroxymetabolite nach mehrfacher Gabe reproduzieren. Auch eine 10tägige Gabe von Amitriptylin führt in den Knockout-Tieren zu höheren Hirnspiegeln der Hydroxymetabolite als bei den Kontrollen <sup>102</sup>.



Nortriptylin als Metabolit von Amitriptylin hemmt ebenfalls Pgp in Lymphoblastomzellen und Schweinehirn-Kapillarendothelzellen in höheren Konzentrationen. Nortriptylin scheint genau wie Amitriptylin ein Substrat von Pgp zu sein. Ejning et al. zeigten, dass in Gegenwart von Cyclosporin A, einem starken Inhibitor von Pgp, die Akkumulation von Nortriptylin im Gehirn erhöht ist<sup>103</sup>. Diese Daten werden von den einzelnen Studien der Gruppe um Uhr gestützt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Nortriptylin ein Substrat von Pgp ist<sup>98,102</sup>. Demnach scheint die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition von Pgp kompetitiv zu sein.

Imipramin und dessen Metabolit Desipramin hemmen Pgp ebenfalls konzentrationsabhängig in den Lymphoblastomzellen. Desipramin zeigt aber in den untersuchten Konzentrationen keinen Effekt in PBCEC-Zellen. In diesen Zellen hemmt Imipramin ebenfalls nur in der höchsten untersuchten Konzentration Pgp. Lessigiarska et al. konnten ebenfalls zeigen, dass Phenothiazine und strukturell verwandte Substanzen, u. a. Imipramin, mit membranären Phospholipiden interagieren und Pgp inhibieren<sup>104</sup>.

Auch das als Anxiolytikum eingesetzte Opipramol hemmt Pgp in höheren Konzentrationen in beiden Zellsystemen. Zu dieser Substanz gibt es in der Literatur allerdings noch keine Daten bezüglich einer Modulation der Transportaktivität von Pgp. Somit ist die vorliegende Studie die erste, die eine Inhibition von Pgp durch Opipramol zeigen konnte.

#### **4.2.2.2 SSRI**

Aus der Klasse der SSRI's wurden Fluoxetin und Citalopram innerhalb dieser Arbeit untersucht. Betrachtet man die Datenlage in der Literatur zu Citalopram stellt man fest, dass die Aussagen widersprüchlich sind. Cyclosporin A, wie oben erwähnt ein bekannter Pgp Inhibitor, modifiziert den Transport von Citalopram nicht, was darauf hindeutet, dass Citalopram kein Substrat von Pgp ist<sup>105</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Uhr et al., dass die Akkumulation von Citalopram im Gehirn in Pgp Knockout-Mäusen wesentlich größer ist als in den Kontrolltieren. Das weist darauf hin, dass Citalopram von Pgp transportiert wird und demnach ein Substrat ist<sup>99</sup>. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass

Citalopram Pgp konzentrationsabhängig inhibiert. In VLB-Zellen zeigen schon geringere Konzentrationen signifikante Effekte als in PBCEC-Zellen. Das zweite untersuchte SSRI Fluoxetin inhibiert den Transport von Calcein-AM ebenfalls in beiden Zellsystemen in höheren Konzentrationen. Fluoxetin ist allerdings laut Literatur kein Substrat des Effluxtransporters Pgp<sup>98</sup>, denn es akkumuliert in den Gehirnen von Pgp Knockout Mäusen nicht stärker als in Kontrollen. Die Inhibition von Pgp durch Fluoxetin sollte also allosterischer Art sein. Peer et al. weisen nach, dass Fluoxetin in acht verschiedenen Zellsystemen Pgp hemmt. Es kann als hocheffektiver Chemosensitizer (Aufhebung der multidrug resistance durch Inhibition von Pgp) eingesetzt werden und das in Dosen, die für Menschen sehr gut verträglich und ungefährlich sind<sup>106</sup>. Eine große Studie von Juurlink et al. zeigt hingegen, dass die Inhibition von Pgp durch Fluoxetin wohl keinerlei klinische Relevanz besitzt<sup>107</sup>. Sie analysierten 245305 Patienten, die Digoxin (Substrat von Pgp) und ein SSRI in Komedikation erhielten. Das Ergebnis der Studie war, dass die Toxizität von Digoxin weder in Komedikation mit Fluoxetin noch mit Paroxetin, Fluvoxamin oder Sertralin steigt. Da Digoxin nicht über Cytochrome metabolisiert wird, könnte eine eventuelle pharmakokinetische Interaktion nur über Pgp stattfinden. Sie stellen keine Interaktionen fest – und das an einem sehr großen Patientenkollektiv. Diese Feststellung wird durch die Daten der vorliegenden Arbeit gestützt. Auch hier hemmen die Substanzen Pgp nur in Konzentrationen, die nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen nicht erreicht werden (siehe auch Tabelle 4-1).

#### **4.2.2.3 SNRI**

Der einzige untersuchte Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor Reboxetin inhibiert die Transportaktivität von Pgp in Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  in VLB-Zellen und in Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  in PBCEC-Zellen signifikant. Diese Daten wurden von denen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt. Weiss et al. zeigten, dass Reboxetin in zwei unterschiedlichen Zellsystemen Pgp inhibiert <sup>74</sup>. Auch deren Ergebnisse weisen darauf hin, dass Reboxetin ein schwacher Pgp-Modulator ist.

#### **4.2.2.4 Tetracyclika**

Als letzte zu diskutierende Klasse bleiben die Tetracyclika. Aus dieser Gruppe wurde Mirtazapin bezüglich einer Modulation von Pgp untersucht. Diese Substanz hemmt Pgp in den Lymphoblastomzellen in höheren Konzentrationen signifikant, zeigt allerdings in PBCEC-Zellen in den untersuchten Konzentrationen keinen Effekt. Uhr et al. fanden, dass Mirtazapin kein Substrat von Pgp ist. Die Akkumulation im Gehirn von Knockout-Mäusen ist mit der von Kontrolltieren übereinstimmend <sup>108</sup>. Demnach deutet hier, ebenso wie bei Fluoxetin, alles auf eine allosterische Hemmung hin.

#### **4.2.2.5 Zusammenfassung**

Man kann sagen, dass die Hemmung von Pgp durch die in dieser Arbeit untersuchten Antidepressiva nach diesen *in-vitro* Untersuchungen wohl physiologisch keine klinische Relevanz besitzt. Die Konzentrationen, die hemmende Effekte zeigen, liegen weit über den im Plasma erreichten Konzentrationen nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen. In Tabelle 4-1 sind die erforderlichen Plasmakonzentrationen von diversen Antidepressiva und Antipsychotika gezeigt <sup>109</sup>. Diese Erkenntnisse zeigen, dass es in Comedikation mit diesen Substanzen wohl zu keinen klinisch messbaren Interaktionen mit anderen zusätzlich applizierten Arzneimitteln kommen wird. Allerdings sind die Literaturdaten zu dieser Thematik kontrovers.

**Tabelle 4-1: Therapeutische Plasmakonzentration von verschiedenen Antidepressiva und Antipsychotika nach P. Baumann et al., Pharmacopsychiatry 2004; 37 (6): 243-265**

Substanz	Plasmakonzentration
Amitriptylin	0,28 – 0,72 µM
Citalopram	0,09 – 0,40 µM
Clomipramin	0,56 – 1,40 µM
Desipramin	0,38 – 1,10 µM
Fluoxetin	0,39 – 0,97 µM
Imipramin	0,62 – 1,10 µM
Mirtazapin	0,15 – 0,30 µM
Nortriptylin	0,27 – 0,65 µM
Reboxetin	0,03 – 0,32 µM
Chlorpromazin	0,09 – 0,94 µM
Clozapin	1,1 – 1,8 µM
Haloperidol	0,01 – 0,05 µM

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich ein Teil der antidepressiven Wirksamkeit von diversen Antidepressiva über eine Normalisierung der Funktion der HPA-Achse erklären lassen soll. Allerdings zeigten Pariante et al nicht direkt, dass diese Substanzen membranständige Glucocorticoidtransporter hemmen. Sie zeigten nur, dass die Erhöhung der GR-vermittelten Gentranskription in Gegenwart von Verapamil blockiert ist<sup>17</sup>. Daher sollte diese Arbeit zeigen, ob Antidepressiva verschiedenster Klassen membranständige Transporter wie Pgp, welches erwiesenermaßen Glucocorticoide transportiert<sup>51,53,58</sup>, zu hemmen vermögen. Pariante zeigte, dass Clomipramin und Amitriptylin aus der Klasse der Tricyclika die GR-vermittelte Gentranskription erhöhen – Clomipramin ist stärker wirksam als Amitriptylin. Beide Substanzen hemmen ebenfalls in den Versuchen der vorliegenden Arbeit den Efflux durch Pgp und interessanterweise ist Clomipramin ein potenterer Inhibitor als Amitriptylin. Jedoch ist die Hemmung erst in hohen Konzentrationen, die sich nach Gabe von therapeutisch relevanten Dosen im Plasma nicht erzielt werden, signifikant. Pariante zeigte ebenfalls, dass Fluoxetin und Citalopram aus der Gruppe der SSRI's die GR-gekoppelte Gentranskription erhöhen<sup>17,78</sup>. Beide Substanzen inhibieren in den

in dieser Arbeit verwendeten Assays die Transportaktivität von Pgp – jedoch wie schon bei den tricyclischen Substanzen beobachtet – erst in sehr hohen Konzentrationen. Diese werden nach Gabe therapeutischer Dosen nicht erreicht.

So bleibt festzustellen, dass zwar alle untersuchten Antidepressiva membranständige Transporter wie Pgp, inhibieren, aber diese Inhibition auf Grund hoher Konzentrationen wohl keine physiologische Relevanz besitzt. Allerdings sind die in dieser Arbeit verwendeten Methoden bezüglich der Hemmung von Pgp reine *in-vitro* Modelle und es bleibt offen, ob *in-vivo* die Pgp-Hemmung nicht vielleicht doch eine Relevanz besitzt.

#### 4.2.3 Antipsychotika

Um zu untersuchen, ob der Pgp-hemmende Effekt eine Eigenschaft ist, die nur Antidepressiva aufweisen und keine anderen ZNS-wirksamen Arzneistoffklassen, wurden einige Antipsychotika als Kontrollsubstanzen untersucht. Alle drei getesteten Antipsychotika inhibieren in unterschiedlichem Ausmaß die Transportaktivität von Pgp. Ausgeprägt ist die Hemmung jedoch – genau wie bei den Antidepressiva – nur in höheren Konzentrationen. Es ließen sich bei diesen 3 Substanzen EC<sub>50</sub> Werte bestimmen. Sie betragen für Haloperidol 8,6 µM, für Clozapin 21,6 µM und für Chlorpromazin 20,1 µM in VLB-Zellen.

In der Literatur werden verschiedene und teils kontroverse Daten zur Modulation von Pgp durch Antipsychotika berichtet. El Ela et al. haben zum Beispiel Haloperidol und Clozapin in einem Assay mit Talinolol als Pgp Substrat untersucht. Die von Ihnen bestimmten EC<sub>50</sub> Werte sind mit denen aus dieser Arbeit vergleichbar ( Clozapin 92,78 µM ± 1,13 und Haloperidol 12,43 µM ± 0,03) <sup>66</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe hat nicht die Hemmung selbst, sondern die Modulation der ATPase Aktivität von Pgp untersucht. Sie untersuchten sowohl die klassischen Antipsychotika Haloperidol und Chlorpromazin als auch das atypische Clozapin. Alle drei Substanzen stimulieren die ATPase Aktivität von Pgp in einer konzentrations- und zeitabhängigen Art und Weise. Diese Arbeitsgruppe klassifiziert die Substanzen als Klasse 1 Stoffe, dass heißt, dass

sie in niedrigen Konzentrationen die ATPase Aktivität stimulieren und in hohen Konzentrationen inhibieren. Des Weiteren sagen sie, dass Chlorpromazin nur eine schwache Affinität für Pgp hat, während Clozapin und Haloperidol wahrscheinlich von Pgp transportiert werden <sup>110</sup>. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kommen allerdings Henning et al. zu dem Schluß, dass Clozapin kein Substrat von Pgp ist <sup>111</sup>. Sie haben gemessen, dass die intrazelluläre Akkumulation von Clozapin durch Gegenwart von Cyclosporin A nicht verändert wird. Diese Daten werden von der Gruppe um Lane et al. unterstützt. Diese zeigen ebenfalls, dass Clozapin kein Substrat von Pgp ist <sup>112</sup>. Ibrahim et al haben die Inhibition von Pgp durch Chlorpromazin, Clozapin und Haloperidol untersucht. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass Chlorpromazin Pgp in Konzentrationen blockt, die therapeutische Relevanz besitzen. Clozapin und Haloperidol blocken in diesem Assay Pgp auch, allerdings erst in höheren Konzentrationen <sup>113</sup>. Die Daten bezüglich Chlorpromazin werden von einer weiteren Arbeitsgruppe gestützt. Diese kommen zu dem Ergebnis, dass Chlorpromazin in Membranvesikeln von Pgp transportiert wird <sup>114</sup>. Eine weitere Gruppe hat diverse Antipsychotika im Rhodamin 123 Assay bezüglich einer eventuellen Modulation von Pgp untersucht. Haloperidol und Fluphenazin waren in diesem Assay die aktivsten Substanzen und haben die relative Fluoreszenzintensität stark erhöht <sup>115</sup>.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten zur Hemmung von Pgp durch Antipsychotika in der Literatur unterschiedlich sind. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Hemmung von Pgp keinerlei klinische Relevanz besitzt, weil sie erst in sehr hohen Konzentrationen auftritt. Dies sind Konzentrationen, die man nach Baumann et al. nicht erreicht (siehe Tabelle 4-1). Antipsychotika werden eingesetzt in Plasmakonzentrationen von 10 bis 500 ng/ml, abhängig von der Substanz und der Sensitivität des Patienten <sup>115</sup>. Die EC50 Werte der hier untersuchten Substanzen liegen allerdings weit über dieser Konzentration. Bezüglich einer eventuellen Relevanz für Arzneimittelinteraktionen kann man also nur sagen, dass eine Hemmung von Pgp für diese drei Substanzen keine klinische Relevanz besitzen wird. Allerdings sind alle hier genannten Daten *in-vitro* gemessen worden. Es bleibt

also abschließend zu klären, ob die Hemmung von Pgp *in-vivo* vielleicht doch eine gewisse Relevanz besitzt.

Diese Substanzen wurden als Vergleich zu den Antidepressiva untersucht. Wenn man nun postuliert, dass Antidepressiva einen Teil ihrer Wirkung durch Erhöhung der GR-vermittelten Gentranskription durch Hemmung membranständiger Glucocorticoidtransporter entfalten, ist es interessant zu untersuchen, ob Antipsychotika, die in erster Linie nicht antidepressiv wirken sollen, diese Wirkung nicht haben. Man kann anhand der Hemmung von Pgp keinen Unterschied zwischen Antidepressiva und Antipsychotika festmachen. Die Hemmung von Pgp ist also keine Eigenschaft, die typisch für Antidepressiva ist.

#### 4.2.4 Inhibition von Pgp und intrazellulärer ATP-Spiegel

Weil Pgp zu den Energie-abhängigen Transportern gehört, benötigt es ATP um Substanzen aus Zellen hinaus zu befördern. Daher wurde untersucht, ob die Substanzen, die Pgp inhibieren, dieses vielleicht über eine Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels machen. Von allen untersuchten Substanzen senken Hypericin, Hyperforin, Clomipramin und Chlorpromazin die intrazelluläre ATP-Konzentration signifikant ab. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Senkung eine Relevanz für die Transportfunktion von Pgp besitzt.

Die Ergebnisse mit  $H_2O_2$  zeigen, dass sich die im Calcein-Assay gezeigten hemmenden Effekte nicht durch eine Absenkung der intrazellulären ATP-Spiegel erklären lassen. Selbst wenn die Konzentration von ATP innerhalb der Zelle um 50% reduziert wird, arbeitet Pgp noch ganz normal und transportiert Substanzen wie Calcein-AM ins umgebende Medium. Daher muß es sich bei der im Calcein-AM-Assay gezeigten Inhibition der Transportfunktion von Pgp um einen direkten Effekt auf den Transporter handeln. Die hier verwendeten Assays lassen allerdings keine Unterscheidung bezüglich der Art der direkten Hemmung zu. Es könnte sich sowohl um eine kompetitive Hemmung handeln, d.h. die inhibierende Substanz ist selbst Substrat von Pgp und wird ebenfalls transportiert, als auch um eine allosterische Hemmung handeln. Substanzen, die Pgp in allosterischer Weise inhibieren werden nicht selbst von Pgp transportiert und sind somit auch keine Substrate für diesen Transporter. Zusammengefaßt bedeutet das, dass es sich bei allen untersuchten Substanzen um Stoffe handelt, die Pgp durch direkte Interaktion mit dem Transporter hemmen. Es handelt sich nicht um den indirekten Effekt der Senkung des intrazellulären ATP-Spiegels.



### **4.3 Veränderung der Expression von P-Glykoprotein *in-vitro* und *in-vivo***

#### **4.3.1 *In-vitro***

*In-vitro* wurde der Johanniskrautextrakt (LI 160), Hyperforin und Quercetin auf potentielle Veränderung der Expression von Pgp auf Proteinebene mittels Westernblot untersucht. In einem anderen Zellsystem wurde aktuell gezeigt, dass Johanniskrautextrakt und Hyperforin die Expression von Pgp induzieren, während Hypericin keinen Effekt hat. Die Arbeitsgruppe um Tian setzte LS 180 Zellen ein und kam zu dem Ergebnis, dass Hyperforin die Komponente des Extraktes darstellt, die die Pgp-Induktion verursacht. Sie stellen die Hypothese auf, dass es bei chronischer Applikation von Johanniskrautextrakt zu klinisch relevanten Interaktionen auf Grund der Zunahme der Expression von Pgp kommen kann <sup>116</sup>. An dem gleichen Zellsystem hat eine andere Arbeitsgruppe einige Jahre vorher ähnliche Experimente durchgeführt. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass Johanniskrautextrakt und Hypericin in klinisch relevanten, niedrigen Konzentrationen die Pgp-Expression erhöhen <sup>117</sup>. Die Ergebnisse bezüglich Hypericin stehen damit in einem Gegensatz zu denen der Arbeitsgruppe um Tian.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Daten der Arbeitsgruppe um Tian et al., denn auch an den hier verwendeten Zellen kommt es nach Inkubation mit Johanniskrautextrakt und Hyperforin zu einer erhöhten Expression von Pgp. In den CEM-Zellen, die wie mittels Western Blot gezeigt nur basale Mengen von Pgp exprimieren, steigt die Proteinmenge nach 24stündiger Inkubation mit dem Extrakt und Hyperforin deutlich an. In den VLB-Zellen, die von Natur aus schon sehr große Mengen von Pgp exprimieren, lässt sich die Expression nicht wesentlich steigern. Diese Zellen haben also natürlich so viel Pgp in ihrer Zellmembran, dass sich die Proteinmenge nicht weiter induzieren lässt. Quercetin zeigt keine Effekte auf die Expression in den Zellen.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass der Johanniskrautextrakt genau wie Hyperforin die Expression von Pgp in den Lymphoblastomzellen induziert. Die Induktion von Hyperforin allein ist ähnlich ausgeprägt wie die des

Gesamtextraktes. Es scheint also plausibel zu sein, dass Hyperforin innerhalb des Extraktes die Komponente darstellt, die die Expression von Pgp erhöht.

#### 4.3.2 In-vivo

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob nach subchronischer Applikation von Johanniskrautextrakt die Expression von Pgp im Gehirn von Mäusen verändert wird. *In-vivo* wurde demnach ebenfalls Johanniskrautextrakt untersucht, aber zusätzlich nicht dessen Inhaltsstoffe, sondern andere Antidepressiva. Bei der Wahl der einzelnen antidepressiven Stoffe, die bezüglich der Expressionsveränderung untersucht werden sollten, lag das Hauptaugenmerk darauf, möglichst viele unterschiedliche Klassen abzudecken. Daher wurde aus der Klasse der Tricyclika die gängige und häufig verordnete Substanz Amitriptylin gewählt. Aus der Klasse der selektiven-Serotonin-Reuptake-Inhibitoren Fluoxetin, ein weltweit sehr häufig verordnetes Antidepressivum und aus der Klasse der tetracyclischen Substanzen Mirtazapin. Damit stand fest, dass es 4 unterschiedliche Gruppen plus eine Kontrollgruppe geben muß. Da nicht von allen Stoffen Reinsubstanzen erhältlich waren, wurden diese als Verreibungen aus Tabletten bzw. Kapseln eingesetzt. Damit ergab sich, dass es 2 Kontrollgruppen geben muß: eine, die nur Vehikel erhält und eine, die eine Placebomischung bekommt um den Einfluß von Hilfsstoffen auszuschalten. Von daher wurden 2 subchronische Studien durchgeführt. In einer subchronischen Studie wurde der Einfluß auf die Expression von Pgp durch Amitriptylin und Johanniskrautextrakt als Reinsubstanz gegen Vehikel getestet und in der zweiten wurden Mirtazapin und Fluoxetin gegen Placebomischung getestet.

Im Laufe der Studien stellte sich heraus, dass die Placebomischung keinerlei Einfluß auf die gemessenen Parameter hatte, damit auch nicht auf die Expression von Pgp. Daher wurden die beiden Kontrollgruppen zusammengefasst dargestellt. Es musste aus diesem Grund auch kein Unterschied zwischen Behandlung einer Reinsubstanz und Behandlung einer Verreibung gemacht werden.

Innerhalb der akuten Studie wurde die Expression von Pgp mittels Westernblot ebenfalls überprüft. Nach akuter Einmalgabe der Substanzen und Tötung der Tiere 1h nach Applikation waren keine signifikanten Effekte auf die Expression von Pgp im Gehirn erkennbar. Tötet man die Tiere eine Stunde nach Applikation der Substanzen ist keine signifikante Änderung der Expression von Proteinen, an dieser Stelle Pgp, zu erwarten. Eine Stunde ist ein zu geringer Zeitraum um einen Effekt auf genetischer Transkriptionsebene zu bewirken. Daher entsprachen die Ergebnisse voll und ganz den Erwartungen und werden in dieser Arbeit nicht näher gezeigt.

Appliziert man die Substanzen hingegen an 14 aufeinander folgenden Tagen und tötet die Tiere am Tag 15 sind sehr wohl Unterschiede in der Expression von Pgp im Gehirn unter den einzelnen Behandlungsgruppen zu erkennen. Dies entsprach ebenfalls den Erwartungen, weil der Zeitraum von 2 Woche lang genug ist um Transkriptionsunterschiede zu zeigen. Nicht alle Substanzen veränderten die Expression von Pgp. Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin haben keinen Einfluß auf die Expression von Pgp. In der Literatur sind keine Daten zur Veränderung der Pgp Menge in der Zellmembran bekannt. Somit sind diese Daten die ersten erhältlichen, die zweifelsfrei zeigen, dass weder Amitriptylin noch Fluoxetin oder Mirtazapin Pgp im Gehirn induzieren.

Die Gruppe, die 14 Tage 300 mg/kg KG Johanniskrautextrakt erhalten hatte, zeigt eine signifikant erhöhte Menge von Pgp im Hirnhomogenat. Der Extrakt induziert also die vermehrte Expression von Pgp. Diese Daten werden von anderen Arbeitsgruppen sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Studien am Menschen bestätigt. Die Daten, die in tierexperimentellen Versuchen gewonnen wurden, messen die Expression von Pgp in völlig unterschiedlichen Kompartimenten (Darm, Leber) und sind somit schwer miteinander zu vergleichen. 2000 zeigten Dürr et al., dass nach 14tägiger Behandlung von Ratten die Expression von Pgp im Darm durch Johanniskraut erhöht wird. Somit wurde in dieser Studie zwar die Expression in einem anderen Kompartiment gemessen, jedoch war die Induktion ebenfalls erkennbar<sup>83</sup>. Die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe stehen jedoch im Kontrast zu denen aus der vorliegenden Arbeit und der von Dürr. Shibayama et al. fanden nach

Behandlung von Ratten mit Johanniskrautextrakt für 10 Tage keine Veränderung der Expression von Pgp in der Leber<sup>83,118</sup>. Somit sind die Daten aus Tierstudien nicht einheitlich was die Expression von Pgp nach Gabe von Johanniskrautextrakt angeht und geben keinen eindeutigen Hinweis auf eventuelle Interaktionen durch eine Erhöhung der Expression von Pgp. Die Daten, die in klinischen Studien an Probanden erhalten wurden, sind hingegen konsistent, auch wenn hier ebenfalls verschiedene Kompartimente (Darm, Blutzellen) des Körpers auf die Expression von Pgp hin untersucht werden. Dürr et al. zeigten in einer klinischen Studie mit 8 gesunden Probanden, dass nach 14 Tagen Johanniskrauteinnahme (3 x 300 mg pro Tag), die Expression von Pgp im Duodenum erhöht wurde<sup>83</sup>. In einer anderen klinischen Studie fanden Hennessy et al. 2001, dass 1800mg Johanniskrautextrakt pro Tag die Expression und Aktivität von Pgp erhöhen. Sie maßen Expression/Aktivität in peripheren Blutzellen und fanden signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Placebogruppe<sup>119</sup>. Durch die Induktion von Pgp kann es daher in der Therapie zu klinisch relevanten pharmakokinetischen Interaktionen mit Johanniskrautextrakt unter anderem über Pgp (und Cytochrome) kommen. Diese Interaktionen sind bis dato jedoch nur in pharmakokinetischen Studien gemessen worden und nicht in klinischen Studien (außer Cyclosporin). Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Interaktion zwischen Johanniskrautextrakt und Cyclosporin. Alle diese Studien oder Fallberichte deuten darauf hin, dass die Interaktion auf einer Kombination der Induktion von Cytochromen und Pgp durch den Extrakt beruht. So kam es zu zwei akuten Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (Herz) als Johanniskrautextrakt zusätzlich zu Cyclosporin eingenommen wurde<sup>85</sup>. Die Arbeitsgruppe um Barone berichtet von einer jungen Frau, die Leber und Pankreas transplantiert bekommen hat und aus diesem Grund Cyclosporin nimmt. Nachdem sie angefangen hat Johanniskrautextrakt einzunehmen, sinkt der Cyclosporin-Plasmaspiegel stark ab und es kommt zur Transplantatabstoßung<sup>65</sup>. Mai et al. konnten innerhalb einer klinischen Studie an 10 Patienten mit Nierentransplantation beweisen, dass die Interaktion zwischen Cyclosporin und Johanniskraut auf das im Extrakt enthaltene Hyperforin zurückzuführen ist<sup>120</sup>. Sie haben die Interaktion mit Cyclosporin mit zwei Johanniskrautextrakten untersucht. In der Studie erhält die eine Gruppe 3

mal täglich LI160 mit normaler Hyperforinkonzentration und die andere Gruppe 3 mal täglich einen Extrakt, dem das Hyperforin entzogen wurde. Die Gruppe, die den Extrakt ohne Hyperforin erhält, zeigt keine Interaktionen. Die Gruppe, die den normalen Extrakt eingenommen hat, zeigt eine deutliche Absenkung der Cyclosporin-Plasmakonzentration.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cytochromen und auch von Pgp durch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) reguliert wird<sup>29,121</sup>. Hyperforin ist ein starker Aktivator des PXR<sup>121</sup>. Somit wird die Erhöhung der Expression von Cytochromen und Pgp durch Johanniskrautextrakt durch eine Aktivierung des PXR durch Hyperforin begründet. Diese Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Die Erhöhung der Expression im Gehirn war jedoch nicht so stark ausgeprägt, als daß man klinisch relevante Interaktionen zwischen Johanniskrautextrakt und anderen Substanzen an der Bluthirnschranke erwarten könnte.

#### **4.3.3 Zusammenfassung**

Nach 2wöchiger oraler Applikation erhöht Johanniskrautextrakt die Expression von Pgp im Gehirn von Mäusen. Auch im zellulären Experiment induziert der Extrakt die Bildung von Pgp. Hyperforin als einer der Hauptinhaltsstoffe des Extraktes ist ebenfalls in der Lage Pgp nach 24stündiger Inkubation die Expression von Pgp in Lymphozyten zu induzieren. Da Hyperforin allein die Expression in ähnlichem Ausmaß erhöht wie der Gesamtextrakt, ist es plausibel zu sagen, dass die Induktion der Expression von Pgp durch Johanniskrautextrakt auf die Wirkung von Hyperforin zurückzuführen zu sein scheint. Es wurden jedoch nicht alle Inhaltsstoffe des Extraktes einzeln untersucht, so daß es offen bleibt, ob weitere Inhaltsstoffe ebenfalls die Expression von Pgp induzieren. Da Hyperforin ein bekannter starker Aktivator des PXR ist kann man schließen, dass die Erhöhung der Expression von Pgp und Cytochromen durch eine Aktivierung des PXR durch Hyperforin zustande kommt. Amtriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin haben nach zweiwöchiger Behandlung keinen Einfluß auf die Expression von Pgp.

#### **4.4 Corticosteron-Konzentrationen in Plasma und Hirn nach akuter und subchronischer Gabe von verschiedenen Antidepressiva**

Die vier innerhalb der Behandlungsstudien bezüglich ihres Einflusses auf die Verteilung von Corticosteron zwischen Plasma und Gehirn untersuchten Substanzen zeigen unterschiedliche Auswirkungen. Daher sollen sie im Folgenden getrennt genannt und diskutiert werden. Da Cortisol als Glucocorticoid nicht in Nagern vorkommt und dessen Rolle in Mäusen und Ratten durch Corticosteron übernommen wird, werden hier in der Diskussion Daten zu Corticosteron und Cortisol zusammen genannt. Wenn es sich um tierexperimentelle Versuche handelt wurde Corticosteron untersucht, wenn es sich jedoch um klinische Studien an Menschen handelt wurde die Konzentration von Cortisol untersucht.

Die Effekte der einzelnen untersuchten Antidepressiva nach einmaliger Akutgabe unterscheiden sich substanzabhängig. Dies zeigt, dass es sich um substanzvermittelte und keine Stress-induzierten Veränderungen durch den Stress der Schlundsondierung handelt. Allerdings sieht man in Kontrollexperimenten, daß die Schlundsondierung – wie zu erwarten – einen Stressor für die Tiere darstellt. Wenn die Tiere 1h nach der Schlundsondierung getötet werden und man deren Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn misst, erkennt man eine leichte, wenn auch nicht signifikante Erhöhung der Corticosteronkonzentration. Im Gehirn ist diese Erhöhung etwas schwächer ausgeprägt als im Plasma, die Diffusion scheint also vom Plasma ins Gewebe nicht so schnell stattzufinden. Nach subchronischer Applikation fand eine 24stündige Washout Phase vor der Tötung statt. Dies wirkt sich auch auf den Stress der Tiere aus. Hier erkennt man, daß die Tiere weniger gestresst sind als in der akuten Studie.

#### 4.4.1 Johanniskrautextrakt

Nach akuter Einmalgabe und Tötung eine Stunde nach Applikation erhöht Johanniskraut die Konzentration von Corticosteron im Plasma signifikant. Im Gehirn erhöht es die Konzentration ebenfalls, allerdings nicht ganz so deutlich und nicht signifikant. Subchronisch erhöht die Gabe von Johanniskraut ebenfalls den Corticosteronspiegel im Plasma der Mäuse signifikant. Im Gehirn wird die Konzentration von Corticosteron nach 14tägiger Gabe ebenfalls signifikant erhöht. Allerdings ist eindeutig zu erkennen, dass es weder nach akuter Applikation des Extraktes noch nach subchronischer Gabe zu einer veränderten Verteilung zwischen Plasma und Gehirn, respektive Anreicherung in Gewebe oder Plasma, von Corticosteron der behandelten Tiere kommt. In beiden Kompartimenten wird die Konzentration von Corticosteron nahezu gleich erhöht, wenn sich auch die massive Erhöhung im Plasma nach akuter Gabe noch nicht so deutlich im Gehirn widerspiegelt. Bildet man nun eine Korrelation zusammen mit der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe ergibt sich eine signifikante Korrelation. Die Steigung der linearen Regressionsgraden unterscheidet sich nicht wesentlich von der der Kontrollgruppe alleine. Demnach ruft die Behandlung mit Johanniskrautextrakt zwar eine stärkere Erhöhung von Corticosteron hervor als die Behandlung mit Vehikel, ohne jedoch die Verteilung zwischen Plasma und Gehirn zu verändern.

Die Daten in der Literatur zum Einfluß von Johanniskrautextrakt auf den Corticosteron- und Cortisolspiegel sind kontrovers. In tierexperimentellen Studien wurden an Ratten folgende Ergebnisse erzielt. Franklin et al. zeigten 2000 an Ratten nach i.p. Applikation (Einmalgabe), dass LI160, Hypericin und Hyperforin signifikant den Plasmacorticosteronspiegel erhöhen<sup>122</sup>. Diese Daten stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Da sich der Anstieg von Corticosteron durch Ketanserin, einen 5-HT<sub>2</sub> Rezeptorantagonisten blocken lässt, schließen Franklin et al., dass die Erhöhung der Corticosteronkonzentration im Plasma über 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren vermittelt wird<sup>122</sup>. Diese Reaktion kommt über die Erhöhung von Serotonin im synaptischen Spalt durch die Reuptakehemmung von Johanniskrautextrakt zustande und nicht über eine direkte Rezeptorblockade<sup>86</sup>. Franklin untersuchte ebenfalls den Einfluß von Johanniskrautextrakt auf die Verteilung von Corticosteron in der

Ratte nach subchronischer Applikation. Ratten erhielten 2 Wochen lang ca 75 mg Extrakt oral über das Futter. In dieser Studie wird die Konzentration von Corticosteron im Gehirn signifikant reduziert, während im Plasma keine Veränderung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle zu erkennen ist <sup>123</sup>. Die Konzentration von Corticosteron im Gehirn der Ratten ist in dieser Studie wesentlich höher als im Plasma. Die dort gezeigte Verteilung würde für eine aktive Aufnahme von Corticosteron ins Gehirn mit Anreicherung in diesem Kompartiment sprechen. Diese Ergebnisse können durch die vorliegende Arbeit nicht unterstützt werden. Hier erhöht Johanniskrautextrakt den Spiegel von Corticosteron im Gehirn signifikant. Butterweck et al. fanden in Ratten nach 2 wöchiger Behandlung ebenfalls eine Absenkung der Plasmacorticosteronspiegel, die jedoch nach 8 Wochen Behandlung nicht mehr zu sehen ist <sup>124</sup>. Sie applizieren allerdings 500 mg/kg KG des Extraktes über diesen Zeitraum. Sie führen den Effekt auf das im Extrakt enthaltene Hypericin und verschiedene Flavonoide zurück. Denn sie fanden in einer weiteren Studie, daß Flavonoide Corticosteron absenken können. Sie applizierten 3 verschiedene Flavonoide (Hyperosid: 0,6 mg/kg, Isoquercetrin: 0,6 mg/kg, Miquelianin: 0,6 mg/kg) per Schlundsondierung und sahen nach 2 Wochen eine deutliche Absenkung der Konzentration von Corticosteron im Plasma. Die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit können zum einen dadurch erklärt werden, dass in dieser Arbeit Mäuse und keine Ratten verwendet wurden. Eine andere Erklärung könnte beim Extrakt selbst liegen. Da es sich nicht um einen in seiner Zusammensetzung chemisch immer gleich definierten Extrakt handelt, können sich Unterschiede in der Wirkung durch die Zusammensetzung ergeben, außerdem appliziert die Gruppe um Butterweck wesentlich höhere Dosierungen.

Franklin et al. haben nicht nur Experimente mit Ratten durchgeführt, sondern zusätzlich eine Studie an Menschen veröffentlicht. In dieser Studie erhielten 12 gesunde Probanden auf einmal 9 Tabletten (LI 160, Jarsin®), die jeweils 300 mg Johanniskrautextrakt enthalten. Es wurde alle 30 min (insgesamt 240 min) nach Gabe Blut entnommen und untersucht. In dieser Studie wurde kein Unterschied bezüglich des Plasmacortisolspiegels zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe gefunden <sup>125</sup>. Damit stehen die Ergebnisse im Gegensatz



zu denen der gleichen Arbeitsgruppe an Ratten. Schüle et al. untersuchten den Effekt eines anderen Johanniskrautextraktes (WS5570) auf den Cortisolspiegel in gesunden Probanden. 12 Probanden erhielten entweder Placebo oder den Extrakt in unterschiedlichen Dosierungen an 4 aufeinander folgenden Tagen. Es wurde ebenfalls wieder Blut entnommen und untersucht. Auch hier wird der Cortisolspiegel durch die Gabe von Johanniskrautextrakt nicht beeinflusst <sup>126</sup>.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten bezüglich der Beeinflussung des Corticosteron- / Cortisolspiegels in Plasma und Gehirn durch Johanniskrautextrakt nicht sehr einheitlich sind. Die Ergebnisse scheinen stark vom verwendeten Extrakt und dem untersuchten System abzuhängen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig sowohl nach Einmalgabe als auch nach mehrfacher Applikation eine Erhöhung von Corticosteron in Plasma und Gehirn von Mäusen.

#### **4.4.2 Amitriptylin**

In der vorliegenden Arbeit hat Amitriptylin weder nach Einmalgabe noch nach mehrfacher Applikation einen Einfluß auf die Corticosteronkonzentration in Gehirn und Plasma. Demnach kommt es auch zu keiner Verschiebung der Verhältnisse zwischen Gehirn und Plasma. Auch zu dieser Substanz ist die Datenlage relativ kontrovers. Reul et al. haben schon 1993 den Effekt von Amitriptylin auf die HPA-Achse in Ratten untersucht. Die Tiere erhielten 5 Wochen lang oral Amitriptylin über das Trinkwasser. Nach den 5 Wochen ist der Plasmacorticosteronspiegel der behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt <sup>49</sup>. Eine weitere Gruppe konnte mit einem anderen tricyclischen Antidepressivum – Imipramin – nach achtwöchiger oraler Applikation zeigen, dass Corticosteron im Plasma der behandelten Tiere erniedrigt ist <sup>127</sup>. Die beiden bis jetzt genannten Studien sind wesentlich länger angelegt als die der vorliegenden Arbeit. Daher lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse wahrscheinlich durch die verschieden langen Applikationszeiträume erklären. Rota et al. untersuchten den Effekt von Amitriptylin an Patienten, die nach DSM-IV Kriterien eine Major Depression haben. In dieser Studie zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe <sup>128</sup>. Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier der Effekt

wiederum vom untersuchten System abhängig ist. Außerdem scheint der Zeitraum der Applikation (subchronisch – chronisch) eine entscheidende Rolle für den Einfluß von Amitriptylin auf die Corticosteronspiegel zu haben.

#### 4.4.3 Fluoxetin

Die Effekte, die Fluoxetin in der akuten Studie zeigt, werden nach subchronischer Behandlung etwas deutlicher. Akut werden die Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn signifikant erhöht. Nach subchronischer 14tägiger oraler Applikation von Fluoxetin sind der Corticosteronplasmapiegel und der Corticosteronhirnspiegel ebenfalls signifikant erhöht. Im Gegensatz zu Johanniskrautextrakt ist bei Fluoxetin die Erhöhung des Corticosterons im Gehirn nach akuter Einmalgabe schon ähnlich stark ausgeprägt wie die Erhöhung im Plasma. Auch bei dieser Substanz kommt es zu keiner Verschiebung der Corticosteronmenge zwischen Gehirn und Plasma. In beiden Kompartimenten ist die Erhöhung ungefähr gleich stark ausgeprägt. Die Korrelation zusammen mit den Werten der Placebokontrollen ergibt einen signifikanten Zusammenhang. Die Richtung des Effekts von Fluoxetin unterscheidet sich demnach nicht von dem der Kontrolle.

Diese Daten lassen sich durch die bis jetzt veröffentlichten Daten stützen. In einer Studie an Ratten, die für 21 Tage mit Fluoxetin behandelt wurden, fanden Berton et al. heraus, dass der Corticosteronspiegel im Plasma der behandelten Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle steigt <sup>129</sup>. Dieser Effekt ist sowohl basal sichtbar als auch nachdem die Tiere Stress ausgesetzt wurden. Hendrie et al. untersuchten den Einfluß von Fluoxetin auf Plasmacorticosteronlevel in mongolischen Wüstenrennmäusen. Auch diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass Fluoxetin die Konzentration von Corticosteron im Plasma erhöht <sup>130</sup>. Eine klinische Studie mit Fluoxetin zeigt, dass die Einmalgabe von 80 mg Fluoxetin eine leichte Erhöhung des sekretierten Cortisols im Vergleich zu Placebo bewirkt <sup>20</sup>. Die mit Fluoxetin erhobenen Daten werden durch die mit einem anderen SSRI, Citalopram, erhärtet. 1999 zeigten Jensen et al., dass Citalopram akut und subchronisch in Ratten unterschiedliche Effekte hat. Akut erhöht Citalopram hier die Corticosteronkonzentration im Plasma, chronisch allerdings nicht so deutlich,

wie Fluoxetin in der vorliegenden Arbeit <sup>131</sup>. Die Arbeitsgruppe um Attenburrow veröffentlichte, dass der Effekt von Citalopram auf die Cortisolkonzentration im Plasma dosisabhängig ist. Mit 20 mg ist der Effekt stark ausgeprägt, in geringeren Konzentrationen, die allerdings subtherapeutisch sind, weniger deutlich <sup>132</sup>. Dass der Effekt von 20 mg Citalopram in gesunden Probanden auf die Konzentration von Cortisol im Plasma stark ausgeprägt ist, konnte auch eine weitere Studie zeigen <sup>133</sup>. Auch hier wird die Konzentration von Cortisol im Plasma erhöht.

Demnach lässt sich zusammenfassend sagen, dass SSRI's wie Fluoxetin und Citalopram die Spiegel von Corticosteron bzw. Cortisol im Plasma und Gehirn erhöhen. Die in der vorliegenden Arbeit mit Fluoxetin ermittelten Daten gehen mit denen der Literatur konform.

#### **4.4.4 Mirtazapin**

Die Ergebnisse, die mit Mirtazapin bezüglich der Konzentration von Corticosteron in Plasma und Gehirn erhalten wurden unterscheiden sich von den bis jetzt diskutierten Behandlungsgruppen. Während mit Fluoxetin die Ergebnisse, die nach einmaliger Gabe zu sehen waren, nach subchronischer Studie stärker ausgeprägt sind, ist es bei Mirtazapin genau umgekehrt. Nach akuter Einmalgabe erhöht es die Konzentration von Corticosteron im Plasma hochsignifikant und nach subchronischer, 14tägiger Gabe ist dieser Effekt fast nicht mehr zu sehen. Man erkennt nur noch eine ganz leichte Erhöhung des Plasmaspiegels. Im Gehirn ist es ähnlich. Nach einmaliger Gabe erhöht Mirtazapin den Corticosterongehirnspiegel ebenfalls signifikant und nach 14 Tagen Applikation ist kein Effekt im Vergleich zu Placebo zu sehen. Hier handelt es sich also um eine schnelle, spontane Erhöhung nach der ersten Gabe, die nach mehrmaliger Applikation jedoch nicht mehr zu sehen ist. Dennoch ist eine Gemeinsamkeit mit den anderen Substanzen zu erkennen. Die Konzentrationen von Corticosteron in Gehirn und Plasma werden durch die Substanzen jeweils ähnlich stark erhöht. Es kommt auch in dieser Behandlungsgruppe zu keiner Verschiebung der Verteilung von Corticosteron zwischen Gehirn und Plasma.

1999 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Laakmann Ergebnisse aus einer Studie an gesunden Probanden, die 15 mg Mirtazapin peroral erhielten. In dieser Studie zeigte sich, dass die Substanz akut nach Einmalgabe die Konzentration von Cortisol im Plasma erniedrigt <sup>134</sup>. Eine weitere Studie testete den Effekt von Mirtazapin an Patienten, die laut DSM-IV an einer Major Depression leiden. Diese bekamen Mirtazapin 45 mg/d und wurden danach dem DEX/CRH-Test ausgesetzt. Hier wurde also nicht die Cortisolkonzentration direkt bestimmt, aber auch diese Studie zeigt, dass Mirtazapin die Hyperaktivität der HPA-Achse reduziert und damit die Cortisolkonzentration im Plasma sinkt <sup>135</sup>.

Demnach gibt es also einen Unterschied in der Wirkung von Mirtazapin auf den Cortisolspiegel im Menschen im Vergleich zum Corticosteronspiegel im Nager. Im Menschen erniedrigt Mirtazapin die Ausschüttung von Corticosteron, während es in der Maus akut die Ausschüttung erhöht und subchronisch gar nicht beeinflusst.

#### **4.4.5 Zusammenfassung der Corticosterondaten**

Nach dem Betrachten der vier untersuchten Substanzen im Einzelnen kann man zusammenfassend sagen, dass sich in unterschiedlichen Systemen (Mensch / Nager) substanzunabhängig verschiedene Effekte zeigen. Das heißt, die Daten, die im Nager produziert wurden lassen sich nicht mit den an Menschen gewonnenen Daten vergleichen. Zum Teil sind noch nicht mal die Daten in Mäusen und Ratten miteinander vergleichbar.

Je nach unterschiedlicher biochemischer Wirkung unterscheidet sich auch der Effekt der einzelnen Antidepressiva auf die Konzentration von Corticosteron/Cortisol in Gehirn und Plasma. Dies zeigen die in dieser Arbeit ermittelten Daten mit Antidepressiva aus unterschiedlichen Klassen (Tricyclika, Tetracyclika, SSRI und Johanniskrautextrakt). Die Cortisol-/Corticosteronsekretion kann akut durch Antidepressiva erhöht werden, die entweder nur den NA-Reuptake oder nur den 5-HT-Reuptake oder beide zusammen inhibieren <sup>136</sup>. Jedoch erhöhen auch nicht alle Antidepressiva, die den NA- und/oder den 5-HT-Reuptake inhibieren die Cortisol-

/Corticosteronsekretion (Amitriptylin). Dies lässt sich dadurch erklären, dass deren stimulierender Effekt auf die Sekretion von Cortisol/Corticosteron nicht direkt rezeptorvermittelt ist, sondern über eine Erhöhung der Produktion von ACTH aus der Hypophyse läuft <sup>136</sup>. Mirtazapin, welches weder den NA- noch den 5-HT-Reuptake inhibiert nimmt unter den getesteten Antidepressiva eine Sonderstellung ein. Nach akuter Erhöhung der Cortisol-/Corticosteronspiegel hat es subchronisch keinen Effekt mehr auf diese. Es hat also nicht nur eine völlig andere biochemische Wirkweise, sondern auch eine von den übrigen Antidepressiva unterschiedliche Wirkung auf den Cortisol-/Corticosteronspiegel.

Es lässt sich eine Gemeinsamkeit aller behandelten Substanzen erkennen. Es kommt weder nach akuter noch nach subchronischer Behandlung mit einer der Substanzen zu einer Verschiebung der Verhältnisse zwischen Gehirn und Plasma bezüglich der Corticosteronspiegel. Dass heißt, dass weder Johanniskrautextrakt, noch Amitriptylin, Fluoxetin und Mirtazapin Corticosteron entweder im Gehirn oder im Plasma anreichern. Korreliert man die Daten von allen 4 Behandlungsgruppen zusammen mit der Kontrollgruppe ergibt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang.

Vier unterschiedliche Antidepressiva, die alle erwiesenermaßen eine klinische Wirksamkeit zeigen, haben unterschiedliche Effekte auf den Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma. Daher erscheint es logisch zu postulieren, daß der Effekt auf die Konzentration von Corticosteron nicht zur antidepressiven Wirksamkeit beiträgt.

Franklin kommt nach Versuchen an Ratten zu der Schlussfolgerung, daß die Corticosteronfreisetzung über 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren vermittelt wird. Ketanserin, ein 5-HT<sub>2</sub> Rezeptorantagonist kann die Freisetzung von Corticosteron inhibieren <sup>122</sup>. Die Corticosteronspiegel bleiben dann gleich. Johanniskrautextrakt, als indirekter 5-HT<sub>2</sub> Agonist erhöht die Freisetzung von Corticosteron <sup>122</sup>. Mirtazapin, welches ein 5-HT<sub>2</sub> Antagonist ist, hat in dieser Arbeit keinen Einfluß auf die Freisetzung von Corticosteron nach subchronischer Applikation <sup>137</sup>. Diese beiden Substanzen unterstützen demnach die Aussage von Franklin. Bei Amitriptylin handelt es sich ebenfalls um einen 5-HT<sub>2</sub> Antagonisten <sup>138</sup>. Diese

Substanz hat in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Einfluß auf die Corticosteronkonzentration und passt daher in die genannte Hypothese. Fluoxetin hat eine wesentlich schwächere Bindungsaffinität für 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren, wirkt aber als selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor indirekt agonistisch an 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren<sup>138</sup> und bestätigt somit ebenfalls die Hypothese. Denn in den hier durchgeführten Studien erhöht Fluoxetin die Corticosteronkonzentration in Gehirn und Plasma. Somit kann man auch mit den Daten der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufstellen, daß die Corticosteronfreisetzung über 5-HT<sub>2</sub> Agonismus vermittelt wird.

Die Theorie, die hinter dieser Untersuchung steht, besagt, dass depressive Patienten in den Phasen, in denen es ihnen besser geht, erniedrigte Cortisolspiegel im ZNS aufweisen<sup>139,140</sup>. In der Einleitung wurde schon erwähnt, dass Depressive erhöhte Cortisolkonzentrationen aufweisen und eine Erniedrigung dieser zu einer klinischen Besserung führt. Demnach sollte nun untersucht werden, ob Antidepressiva unterschiedlicher Klassen – vielleicht über eine Modulation von Pgp – die Cortisolkonzentration im ZNS zu erniedrigen vermögen. Weil diese Studie an Mäusen durchgeführt wurde, wurde nicht der Cortisolspiegel, sondern der Corticosteronspiegel bestimmt. Da sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass unterschiedliche Antidepressiva mit nachgewiesener klinischer Wirkung nicht alle den Cortisolspiegel erniedrigen, sondern im Gegenteil zum Teil erhöhen, kann die Hypothese von Murck et al., dass Antidepressiva als Teil ihrer klinischen Wirksamkeit den cerebralen Cortisolspiegel erniedrigen, nicht unterstützt werden.

#### 4.5 **Schlußfolgerung**

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bezüglich der Hemmung von Pgp durch verschiedene Antidepressiva zeigen, dass die meisten untersuchten Substanzen Pgp konzentrationsabhängig in den beiden untersuchten Zellsystemen hemmen. Jedoch ist die Hemmung erst in hohen Konzentrationen ausgeprägt und signifikant. Von daher bleibt die Schlussfolgerung, dass die Substanzen Pgp *in-vivo* nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen nicht inhibieren. Dies gilt aber nur dann, wenn sich die *in-vitro* Daten genau auf die *in-vivo* Situation übertragen lassen. Wenn das der Fall ist, lässt sich ein Teil der antidepressiven Wirkung nicht über Hemmung membranständiger Glucocorticoidtransporter wie Pgp erklären. Des Weiteren folgt aus der Tatsache, dass Pgp bei *in-vivo* erreichten Konzentrationen nicht inhibiert wird, dass es bei der Koapplikation von anderen Substanzen zu keiner klinisch relevanten pharmakokinetischen Interaktion über Pgp kommen wird. Einzig Quercetin bildet eine Ausnahme. Dieses aktiviert in Konzentrationen, die *in-vivo* erreicht werden können Pgp. Diese Aktivierung könnte also eine gewisse klinische Relevanz besitzen. Die Untersuchungen lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob die Substanzen in geringeren, *in-vivo* erreichbaren Konzentrationen über Pgp transportiert werden.

Antidepressiva lassen sich durch ihr Verhalten bezüglich der Modulation von Pgp nicht von Antipsychotika unterscheiden. Beide Substanzklassen inhibieren in hohen Konzentrationen die Transportaktivität von Pgp. Von daher lässt sich der Pgp-hemmende Effekt nicht als spezifisch für Antidepressiva darstellen, sondern ist eher ein unspezifischer Effekt, den auch andere Substanzklassen, die ihre Wirkung im ZNS entfalten, aufweisen.

Einige ausgewählte Antidepressiva wurden bezüglich ihrer Wirkung auf Pgp nach längerer Anwendung untersucht. Außerdem wurde getestet, ob sie die Corticosteronverteilung im Körper verändern können. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit drei antidepressiven Substanzen (+ Johanniskrautextrakt als 4. Substanz) behandelt und die Expression von Pgp untersucht. Mirtazapin, Fluoxetin und Amitripylin haben deutlich gezeigt, dass sie die Expression von

Pgp im Gehirn der Tiere nicht verändern. Amitripylin hat zudem keinen Einfluß auf die Corticosteronverteilung und -konzentration zwischen Gehirn und Plasma der gefütterten Tiere. Mirtazapin erhöht akut die Corticosteronkonzentration, nach subchronischer Applikation unterscheiden sich die Corticosteronlevel aber nicht mehr von der unbehandelten Kontrolle. Fluoxetin erhöht sowohl akut als auch subchronisch die Konzentration von Corticosteron in Plasma und Gehirn. Johanniskrautextrakt hat ebenfalls einen Einfluß auf die Corticosteronausschüttung. Es erhöht sowohl akut als auch subchronisch die Konzentration dieses Glucocorticoids in Plasma und Gehirnhomogenat und verhält sich damit ähnlich wie Fluoxetin. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen lässt sich die Hypothese stützen, daß die Corticosteronkonzentration über 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren vermittelt wird. Indirekte 5-HT<sub>2</sub> Agonisten wie Fluoxetin und Johanniskrautextrakt erhöhen die Konzentration von Corticosteron in Plasma und Gehirn, während 5-HT<sub>2</sub> Antagonisten wie Amitriptylin und Mirtazapin diese nicht beeinflussen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe Pgp modulieren. Und zwar wird nicht nur die Aktivität des Transporters beeinflusst, sondern auch die Expression. Nach kurzer Inkubationszeit erkennt man deutlich, dass Johanniskrautextrakt, Hyperforin und Quercetin (in höheren Konzentrationen) Pgp inhibieren. Inkubiert man 24h induzieren der Extrakt und auch Hyperforin die Expression von Pgp. Diese Induktion lässt sich durch eine Aktivierung des PXR durch Hyperforin erklären, welches ein starker Aktivator des PXR darstellt. Die Induktion ist nicht nur im Zellmodell zu beobachten, sondern auch in-vivo im Hirnhomogenat von mit Johanniskrautextrakt behandelten Mäusen (subchronisch) zu sehen.



## 5 Zusammenfassung

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte die These näher untersucht werden, ob sich ein Teil der Wirkung verschiedener Antidepressiva über eine Normalisierung der Funktion der HPA-Achse durch Hemmung membranständiger Glucocorticoidtransporter wie Pgp erklären lässt.

Daher wurden Antidepressiva verschiedener Klassen bezüglich ihrer Hemmung von Pgp in zwei Zellsystemen (Lymphoblastomzellen als Modell für das humane Pgp und Schweinehirnkapillar-Endothelzellen als Modell für die Bluthirnschranke) mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Calcein-AM) untersucht. Die untersuchten Substanzen zeigen alle in höheren Konzentrationen eine Hemmung von Pgp. Da diese Konzentrationen nach Applikation therapeutisch relevanter Dosen *in-vivo* nicht erreicht werden, lässt sich die These, dass ein Teil der antidepressiven Wirkung dieser Substanzen durch Normalisierung der HPA-Achse zu Stande kommt, durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigen. Außerdem sollte es im Zusammenspiel mit den untersuchten Substanzen und koapplizierten Stoffen über eine Modulation von Pgp nicht zu klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen kommen. Die einzige Ausnahme stellt Quercetin dar. Es aktiviert in sehr niedrigen Konzentrationen die Transportaktivität von Pgp. Diese Aktivierung könnte eine physiologische Rolle spielen. Beide Schlussfolgerungen sind aber nur dann richtig, wenn man die erhobenen *in-vitro* Daten auf *in-vivo* Gegebenheiten übertragen kann.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Hemmung von Pgp eine Eigenschaft ist, die Antidepressiva von anderen zentral-wirksamen Substanzklassen unterscheidet. Ausgehend von der Annahme, dass die Hemmung von Pgp zur antidepressiven Wirksamkeit beiträgt, wäre die Schlussfolgerung naheliegend, dass andere Gruppen, wie z.B. Antipsychotika diese Eigenschaft nicht aufweisen. Daher wurden drei verschiedene Antipsychotika bezüglich der Modulation der Aktivität von Pgp im Calcein-AM Assay untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Antipsychotika ebenfalls Pgp in höheren Konzentrationen – ähnlich der hemmenden Konzentrationen von Antidepressiva - inhibieren. Von daher ist die Hemmung von Pgp keine

substanzklassenabhängige Eigenschaft der Antidepressiva, sondern eher eine unspezifische Eigenschaft, die verschiedene ZNS-wirksame Wirkstoffklassen aufweisen.

Des Weiteren wurde die Modulation der Expression von Pgp durch Antidepressiva untersucht. Denn beide Veränderungen, zum einen bezüglich der Aktivität von Pgp und zum anderen bezüglich der Expression von Pgp, können zu klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen führen. Die Expression wurde mittels Westernblot zum einen im zellulären System nach 24stündiger Inkubation untersucht, zum anderen wurden Mäuse oral behandelt und die Proteinmenge von Pgp im Hirnhomogenat dieser Mäuse wurde bestimmt. Pgp wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (C19 im zellulären System und C219 im Hirnhomogenat).

Der Hauptuntersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist Johanniskrautextrakt, daher wurde *in-vitro* der Extrakt selbst und die aus dem Calcein-Assay als potenteste Modulatoren anzusehenden Inhaltsstoffe bezüglich der Expression untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Extrakt selbst und auch Hyperforin die Expression von Pgp induzieren. Die Induktion durch Hyperforin entspricht der durch den Gesamtextrakt, so dass man sagen kann, dass Hyperforin der Inhaltsstoff von Johanniskrautextrakt ist, der die Expression von Pgp induziert. Diese Wirkung kommt über eine Aktivierung des PXR zu Stande, der seinerseits die Expression von Pgp moduliert. Hyperforin ist als starker PXR Ligand charakterisiert. Die Induktion konnte ebenfalls im Gehirn von Mäusen nach 14tägiger oraler Applikation von Johanniskrautextrakt gesehen werden.

Mirtazapin, Fluoxetin und Amitriptylin haben nach 14tägiger oraler Applikation zu keiner Veränderung der Expression von Pgp im Hirnhomogenat von Mäusen geführt.

Für die Versuche bezüglich der Expression von Pgp im Gehirn von Mäusen und für das nächste Untersuchungsziel, die Untersuchung der Verteilung von Corticosteron in Mäusen, wurden Behandlungstudien durchgeführt. Es wurden

männliche, 2-3 Monate alte NMRI-Mäuse oral durch Schlundsondierung mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Es wurden akute (einmalige Applikation und Tötung der Tiere 1h später) und subchronische (14tägige Applikation, Tötung an Tag 15) Studien durchgeführt.

Es sollte überprüft werden, ob Antidepressiva die Verteilung von Glucocorticoiden im Körper (Gehirn/Plasma) modulieren können. Diesbezüglich wurde der Effekt von Johanniskrautextrakt, Mirtazapin, Amitriptylin und Fluoxetin nach akuter Einmalgabe und nach subchronischer 14tägiger oraler Applikation der Substanzen untersucht. Amitriptylin zeigt keinen Effekt auf die Konzentration und/oder Verteilung von Corticosteron, weder nach akuter noch nach subchronischer Gabe. Fluoxetin erhöht die Corticosteronlevel in Gehirn und Plasma sowohl nach Einmalgabe als auch nach subchronischer Applikation signifikant. Mirtazapin erhöht akut ebenfalls Corticosteron in Gehirn und Plasma, nach subchronischer Applikation nivelliert sich dieser Effekt jedoch wieder. Nach 14tägiger Gabe ist kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle zu erkennen. Johanniskrautextrakt verhält sich ähnlich wie Fluoxetin. Es erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle Corticosteron in Plasma und Gehirn sowohl nach akuter als auch nach subchronischer Applikation. Keine der untersuchten Substanzen verschiebt die Verteilung von Corticosteron zwischen Gehirn und Plasma im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Konzentration von Corticosteron im Körper wird über 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren gesteuert. Indirekte Agonisten wie Fluoxetin und Johanniskrautextrakt erhöhen sie, Antagonisten wie Mirtazapin und Amitriptylin verändern sie nicht.

Zusammenfassend kann man bezüglich des Hauptuntersuchungsgegenstandes Johanniskrautextrakt sagen, dass der Extrakt selbst, Hyperforin und Quercetin in der Lage sind, die Transportaktivität von Pgp konzentrationsabhängig zu modulieren. Nach längerer Inkubation induziert der Extrakt durch die Wirkung von Hyperforin als PXR-Aktivator die Expression von Pgp. Darüber hinaus verändert Johanniskrautextrakt die Corticosteronausschüttung bei Mäusen, die oral mit dem Extrakt behandelt wurden, ohne die Verteilung zwischen Gehirn und Plasma zu verändern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Müller WE. Neue Antidepressiva - Mehr Licht in das Dunkel der Seele. *Pharmazeutische Zeitung* **22**, (2000).
2. Comer Ronald J. Klinische Psychologie. Spektrum akademischer Verlag, (2001).
3. Duman,R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular. Med.* **5**, 11-25 (2004).
4. Holoubek,G. & Muller,W.E. Specific modulation of sigma binding sites by the anxiolytic drug opipramol. *J Neural Transm.* **110**, 1169-1179 (2003).
5. Muller,W.E. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* **47**, 101-109 (2003).
6. Wonnemann,M., Singer,A., Siebert,B. & Muller,W.E. Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. *Pharmacopsychiatry* **34 Suppl 1**, S148-S151 (2001).
7. Shelton,R.C. *et al.* Effectiveness of St John's wort in major depression: a randomized controlled trial. *JAMA* **285**, 1978-1986 (2001).
8. Kalb,R., Trautmann-Sponsel,R.D. & Kieser,M. Efficacy and tolerability of hypericum extract WS 5572 versus placebo in mildly to moderately depressed patients. A randomized double-blind multicenter clinical trial. *Pharmacopsychiatry* **34**, 96-103 (2001).
9. Lecrubier,Y., Clerc,G., Didi,R. & Kieser,M. Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J Psychiatry* **159**, 1361-1366 (2002).
10. Linde K.,M.CD. St John's wort for depression (Cochrane Review). *The Cochraine Library* (2004).

11. Szegedi,A., Kohnen,R., Dienel,A. & Kieser,M. Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ* (2005).
12. Gastpar,M., Singer,A. & Zeller,K. Efficacy and tolerability of hypericum extract STW3 in long-term treatment with a once-daily dosage in comparison with sertraline. *Pharmacopsychiatry* **38**, 78-86 (2005).
13. Nemeroff,C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol. Psychiatry* **1**, 336-342 (1996).
14. de Kloet,E.R., Vreugdenhil,E., Oitzl,M.S. & Joels,M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* **19**, 269-301 (1998).
15. Pariante,C.M. & Miller,A.H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol. Psychiatry* **49**, 391-404 (2001).
16. Raison,C.L. & Miller,A.H. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am. J. Psychiatry* **160**, 1554-1565 (2003).
17. Pariante,C.M. *et al.* Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1335-1343 (2001).
18. Okugawa,G. *et al.* Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurones. *J. Neuroendocrinol.* **11**, 887-895 (1999).
19. Holsboer,F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**, 477-501 (2000).

20. von Bardeleben,U., Steiger,A., Gerken,A. & Holsboer,F. Effects of fluoxetine upon pharmacoendocrine and sleep-EEG parameters in normal controls. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **4 Suppl 1**, 1-5 (1989).
21. Herr,A.S., Tsolakidou,A.F., Yassouridis,A., Holsboer,F. & Rein,T. Antidepressants differentially influence the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in vitro. *Neuroendocrinology* **78**, 12-22 (2003).
22. Kunugi,H., Urushibara,T. & Nanko,S. Combined DEX/CRH test among Japanese patients with major depression. *J Psychiatr. Res.* **38**, 123-128 (2004).
23. Stout,S.C., Owens,M.J. & Nemeroff,C.B. Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 1085-1092 (2002).
24. Cordon-Cardo,C. *et al.* Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 695-698 (1989).
25. Thiebaut,F. *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P- glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 7735-7738 (1987).
26. Schinkel,A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 161-170 (1997).
27. Sharom,F.J. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* **160**, 161-175 (1997).
28. Higgins,C.F. & Linton,K.J. Structural biology. The xyz of ABC transporters. *Science* **293**, 1782-1784 (2001).
29. Moore,L.B. *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 7500-7502 (2000).

30. Bauer,B., Hartz,A.M., Fricker,G. & Miller,D.S. Pregnane x receptor up-regulation of p-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol. Pharmacol.* **66**, 413-419 (2004).
31. Goodwin,B., Redinbo,M.R. & Kliewer,S.A. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 1-23 (2002).
32. Geick,A., Eichelbaum,M. & Burk,O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14581-14587 (2001).
33. Owen,A., Chandler,B., Back,D.J. & Khoo,S.H. Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA. *Antivir. Ther.* **9**, 819-821 (2004).
34. Bauer,B. In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glykoprotein-Interaktionen von Arzneistoffen. 2002. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg.

Ref Type: Thesis/Dissertation

35. Schinkel,A.H. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **36**, 9-13 (1998).
36. Schinkel,A.H. *et al.* Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491-502 (1994).
37. Schinkel,A.H., Wagenaar,E., Mol,C.A. & van Deemter,L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest* **97**, 2517-2524 (1996).
38. Skarke,C. *et al.* Effects of ABCB1 (multidrug resistance transporter) gene mutations on disposition and central nervous effects of loperamide in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* **13**, 651-660 (2003).

39. Fromm,M.F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest* **33 Suppl 2**, 6-9 (2003).
40. Sun,J. *et al.* Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med. Sci. Monit.* **10**, RA5-14 (2004).
41. Borst,P., Zelcer,N. & van Helvoort,A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 128-144 (2000).
42. Zhou,S., Chan,E., Pan,S.Q., Huang,M. & Lee,E.J. Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort. *J. Psychopharmacol.* **18**, 262-276 (2004).
43. Romiti,N., Tramonti,G., Donati,A. & Chieli,E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. *Life Sci.* **76**, 293-302 (2004).
44. Mueller,S.C. *et al.* Effect of St John's wort dose and preparations on the pharmacokinetics of digoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**, 546-557 (2004).
45. Christians,U. Transport proteins and intestinal metabolism: P-glycoprotein and cytochrome P4503A. *Ther. Drug Monit.* **26**, 104-106 (2004).
46. Yu,D.K. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J. Clin. Pharmacol.* **39**, 1203-1211 (1999).
47. Schinkel,A.H., Wagenaar,E., van Deemter,L., Mol,C.A. & Borst,P. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest* **96**, 1698-1705 (1995).
48. Pariante,C.M., Thomas,S.A., Lovestone,S., Makoff,A. & Kerwin,R.W. Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? *Psychoneuroendocrinology* **29**, 423-447 (2004).
49. Reul,J.M., Stec,I., Soder,M. & Holsboer,F. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the



- hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology* **133**, 312-320 (1993).
50. Cisternino,S., Rousselle,C., Lorico,A., Rappa,G. & Scherrmann,J.M. Apparent lack of Mrp1-mediated efflux at the luminal side of mouse blood-brain barrier endothelial cells. *Pharm. Res.* **20**, 904-909 (2003).
  51. Muller,M.B. *et al.* ABCB1 (MDR1)-type P-glycoproteins at the blood-brain barrier modulate the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: implications for affective disorder. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1991-1999 (2003).
  52. Ueda,K. *et al.* Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* **267**, 24248-24252 (1992).
  53. Karssen,A.M. *et al.* Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* **142**, 2686-2694 (2001).
  54. Meijer,O.C. *et al.* Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdrlA P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* **139**, 1789-1793 (1998).
  55. Qian,X.D. & Beck,W.T. Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts. *J Biol. Chem.* **265**, 18753-18756 (1990).
  56. Barnes,K.M., Dickstein,B., Cutler,G.B., Jr., Fojo,T. & Bates,S.E. Steroid treatment, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *Biochemistry* **35**, 4820-4827 (1996).
  57. Farrell,R.J., Menconi,M.J., Keates,A.C. & Kelly,C.P. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1021-1031 (2002).

58. van Kalken,C.K. *et al.* Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P- glycoprotein. *Br. J. Cancer* **67**, 284-289 (1993).
59. Uhr,M., Holsboer,F. & Muller,M.B. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 753-759 (2002).
60. Webster,J.I. & Carlstedt-Duke,J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **82**, 277-288 (2002).
61. Huwyler,J., Fricker,G., Torok,M., Schneider,M. & Drewe,J. Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 81-85 (1997).
62. Fricker,G., Nobmann,S. & Miller,D.S. Permeability of porcine blood brain barrier to somatostatin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1308-1314 (2002).
63. Bauer,B., Miller,D.S. & Fricker,G. Compound profiling for P-glycoprotein at the blood-brain barrier using a microplate screening system. *Pharm. Res.* **20**, 1170-1176 (2003).
64. Franke,H., Galla,H. & Beuckmann,C.T. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **5**, 248-256 (2000).
65. Barone,G.W., Gurley,B.J., Ketel,B.L., Lightfoot,M.L. & Abul-Ezz,S.R. Drug interaction between St. John's wort and cyclosporine. *Ann. Pharmacother.* **34**, 1013-1016 (2000).
66. El Ela,A.A. *et al.* Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds--implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 967-975 (2004).

67. Pariante,C.M. *et al.* The antidepressant clomipramine regulates cortisol intracellular concentrations and glucocorticoid receptor expression in fibroblasts and rat primary neurones. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1553-1561 (2003).
68. Foley,G.E. *et al.* Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* **18**, 522-529 (1965).
69. Beck,W.T., Mueller,T.J. & Tanzer,L.R. Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* **39**, 2070-2076 (1979).
70. Muller,M.R. *et al.* Simultaneous measurement of cellular P-glycoprotein content and function by multiparametric flow-cytometry. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 180-186 (2000).
71. Tiberghien,F. & Loo, R.F. Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay. *Anticancer Drugs* **7**, 568-578 (1996).
72. Broxmeyer,H.J. *et al.* Quality control of multidrug resistance assays in adult acute leukemia: correlation between assays for P-glycoprotein expression and activity. *Blood* **87**, 4809-4816 (1996).
73. Loo, R.F., Tiberghien,F., Wenandy,T., Didier,A. & Traber,R. Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. *J. Med. Chem.* **45**, 4598-4612 (2002).
74. Weiss,J. *et al.* Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 197-204 (2003).
75. Eneroth,A. *et al.* Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction. *Eur. J Pharm. Sci.* **12**, 205-214 (2001).
76. Yang,C.P., DePinho,S.G., Greenberger,L.M., Arceci,R.J. & Horwitz,S.B. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells

- and in the endometrium of gravid uterus. *J. Biol. Chem.* **264**, 782-788 (1989).
77. Frohlich,M. *et al.* In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2409-2416 (2004).
78. Pariante,C.M., Kim,R.B., Makoff,A. & Kerwin,R.W. Antidepressant fluoxetine enhances glucocorticoid receptor function in vitro by modulating membrane steroid transporters. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1111-1118 (2003).
79. Pariante,C.M. Depression, stress and the adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 811-812 (2003).
80. Huisman,M.T. *et al.* P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Mol. Pharmacol.* **59**, 806-813 (2001).
81. Cordon-Cardo,C. *et al.* Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1277-1287 (1990).
82. Johnne,A. *et al.* Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 338-345 (1999).
83. Durr,D. *et al.* St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 598-604 (2000).
84. Wang,Z., Hamman,M.A., Huang,S.M., Lesko,L.J. & Hall,S.D. Effect of St John's wort on the pharmacokinetics of fexofenadine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **71**, 414-420 (2002).
85. Ruschitzka,F., Meier,P.J., Turina,M., Luscher,T.F. & Noll,G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* **355**, 548-549 (2000).

86. Muller,W.E., Rolli,M., Schafer,C. & Hafner,U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30 Suppl 2**, 102-107 (1997).
87. Biber,A., Fischer,H., Romer,A. & Chatterjee,S.S. Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**, 36-43 (1998).
88. Keller,J.H. *et al.* Determination of hyperforin in mouse brain by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 6084-6088 (2003).
89. Wang,E.J., Barecki-Roach,M. & Johnson,W.W. Quantitative characterization of direct P-glycoprotein inhibition by St John's wort constituents hypericin and hyperforin. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 123-128 (2004).
90. Critchfield,J.W., Welsh,C.J., Phang,J.M. & Yeh,G.C. Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT- 15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1437-1445 (1994).
91. Scambia,G. *et al.* Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **34**, 459-464 (1994).
92. Shapiro,A.B. & Ling,V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 587-596 (1997).
93. Mitsunaga,Y. *et al.* Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier. *Eur. J. Pharmacol.* **395**, 193-201 (2000).
94. Ott M., Bauer,B., Cornelius M. & Fricker,G. Interactions of Hypericum perforatum compounds with P-Glycoprotein at the blood-brain-barrier. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367(Suppl 1), 8. 1-3-2003. Ref Type: Abstract

95. Limtrakul,P., Khantamat,O. & Pintha,K. Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J Chemother.* **17**, 86-95 (2005).
96. Hollman PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 842-852 (2001).
97. Wang,J.S. *et al.* Olanzapine penetration into brain is greater in transgenic Abcb1a P-glycoprotein-deficient mice than FVB1 (wild-type) animals. *Neuropsychopharmacology* **29**, 551-557 (2004).
98. Uhr,M., Steckler,T., Yassouridis,A. & Holsboer,F. Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P- glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* **22**, 380-387 (2000).
99. Uhr,M. & Grauer,M.T. abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J. Psychiatr. Res.* **37**, 179-185 (2003).
100. Varga,A. *et al.* Reversal of multidrug resistance by amitriptyline in vitro. *Anticancer Res.* **16**, 209-211 (1996).
101. Johne,A. *et al.* Decreased plasma levels of amitriptyline and its metabolites on comedication with an extract from St. John's wort ( *Hypericum perforatum* ). *J. Clin. Psychopharmacol.* **22**, 46-54 (2002).
102. Grauer,M.T. & Uhr,M. P-glycoprotein reduces the ability of amitriptyline metabolites to cross the blood brain barrier in mice after a 10-day administration of amitriptyline. *J. Psychopharmacol.* **18**, 66-74 (2004).
103. Ejlsing,T.B. & Linnet,K. Influence of P-glycoprotein inhibition on the distribution of the tricyclic antidepressant nortriptyline over the blood-brain barrier. *Hum. Psychopharmacol.* (2004).

104. Lessigiarska,I., Pajeva,I., Cronin,M.T. & Worth,A.P. 3D QSAR investigation of the blood-brain barrier penetration of chemical compounds. *SAR QSAR. Environ. Res.* **16**, 79-91 (2005).
105. Rochat,B., Baumann,P. & Audus,K.L. Transport mechanisms for the antidepressant citalopram in brain microvessel endothelium. *Brain Res.* **831**, 229-236 (1999).
106. Peer,D., Dekel,Y., Melikhov,D. & Margalit,R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res.* **64**, 7562-7569 (2004).
107. Juurlink,D.N., Mamdani,M.M., Kopp,A., Herrmann,N. & Laupacis,A. A population-based assessment of the potential interaction between serotonin-specific reuptake inhibitors and digoxin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 102-107 (2005).
108. Uhr,M., Grauer,M.T. & Holsboer,F. Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with abcb1ab (mdr1ab) P-glycoprotein gene disruption. *Biol. Psychiatry* **54**, 840-846 (2003).
109. Baumann,P. *et al.* The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry* **37**, 243-265 (2004).
110. Boulton,D.W., DeVane,C.L., Liston,H.L. & Markowitz,J.S. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci.* **71**, 163-169 (2002).
111. Henning,U., Loffler,S., Krieger,K. & Klimke,A. Uptake of clozapine into HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Pharmacopsychiatry* **35**, 90-95 (2002).
112. Lane,H.Y. *et al.* Repeated ingestion of grapefruit juice does not alter clozapine's steady-state plasma levels, effectiveness, and tolerability. *J. Clin. Psychiatry* **62**, 812-817 (2001).

113. Ibrahim,S., Peggins,J., Knapton,A., Licht,T. & Aszalos,A. Influence of antipsychotic, antiemetic, and Ca(2+) channel blocker drugs on the cellular accumulation of the anticancer drug daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 1276-1283 (2000).
114. Syed,S.K., Christopherson,R.I. & Roufogalis,B.D. Chlorpromazine transport in membrane vesicles from multidrug resistant CCRF-CEM cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **39**, 687-696 (1996).
115. Szabo,D., Szabo,G., Jr., Ocsovszki,I., Aszalos,A. & Molnar,J. Anti-psychotic drugs reverse multidrug resistance of tumor cell lines and human AML cells ex-vivo. *Cancer Lett.* **139**, 115-119 (1999).
116. Tian,R. *et al.* Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's wort and its ingredients in a human colon adenocarcinoma cell line. *Drug Metab Dispos.* **33**, 547-554 (2005).
117. Perloff,M.D., von Moltke,L.L., Stormer,E., Shader,R.I. & Greenblatt,D.J. Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1601-1608 (2001).
118. Shibayama,Y., Ikeda,R., Motoya,T. & Yamada,K. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) induces overexpression of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in rats: a 30-day ingestion study. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 995-1002 (2004).
119. Hennessy,M. *et al.* St John's Wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **53**, 75-82 (2002).
120. Mai,I. *et al.* Hyperforin content determines the magnitude of the St John's wort-cyclosporine drug interaction. *Clin. Pharmacol. Ther.* **76**, 330-340 (2004).
121. Wentworth,J.M., Agostini,M., Love,J., Schwabe,J.W. & Chatterjee,V.K. St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J. Endocrinol.* **166**, R11-R16 (2000).



122. Franklin,M., Chi,J.D., Mannel,M. & Cowen,P.J. Acute effects of LI 160 (extract of *Hypericum perforatum*, St John's wort) and two of its constituents on neuroendocrine responses in the rat. *J. Psychopharmacol.* **14**, 360-363 (2000).
123. Franklin,M., Reed,A. & Murck,H. Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* (St John's wort) significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14**, 7-10 (2004).
124. Butterweck,V., Hegger,M. & Winterhoff,H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. *Planta Med.* **70**, 1008-1011 (2004).
125. Franklin,M. *et al.* Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of hypericum extract (LI 160) in healthy volunteers. *Biol. Psychiatry* **46**, 581-584 (1999).
126. Schule,C., Baghai,T., Sauer,N. & Laakmann,G. Endocrinological effects of high-dose *Hypericum perforatum* extract WS 5570 in healthy subjects. *Neuropsychobiology* **49**, 58-63 (2004).
127. Frost,P. *et al.* The prototypic antidepressant drug, imipramine, but not *Hypericum perforatum* (St. John's Wort), reduces HPA-axis function in the rat. *Horm. Metab Res.* **35**, 602-606 (2003).
128. Rota,E. *et al.* Neuroendocrine (HPA axis) and clinical correlates during fluvoxamine and amitriptyline treatment. *Psychiatry Res.* **133**, 281-284 (2005).
129. Berton,O., Durand,M., Aguerre,S., Mormede,P. & Chaouloff,F. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience* **92**, 327-341 (1999).
130. Hendrie,C.A., Pickles,A.R., Duxon,M.S., Riley,G. & Hagan,J.J. Effects of fluoxetine on social behaviour and plasma corticosteroid levels in female Mongolian gerbils. *Behav. Pharmacol.* **14**, 545-550 (2003).

131. Jensen,J.B. *et al.* Acute and long-term treatments with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram modulate the HPA axis activity at different levels in male rats. *J Neuroendocrinol.* **11**, 465-471 (1999).
132. Attenburrow,M.J., Mitter,P.R., Whale,R., Terao,T. & Cowen,P.J. Low-dose citalopram as a 5-HT neuroendocrine probe. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 323-326 (2001).
133. Seifritz,E. *et al.* Neuroendocrine effects of a 20-mg citalopram infusion in healthy males. A placebo-controlled evaluation of citalopram as 5-HT function probe. *Neuropsychopharmacology* **14**, 253-263 (1996).
134. Laakmann,G., Schule,C., Baghai,T. & Waldvogel,E. Effects of mirtazapine on growth hormone, prolactin, and cortisol secretion in healthy male subjects. *Psychoneuroendocrinology* **24**, 769-784 (1999).
135. Schule,C. *et al.* Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical hyperactivity in depressed patients by mirtazapine. *Psychopharmacology (Berl)* **166**, 271-275 (2003).
136. Schule,C., Baghai,T. & Laakmann,G. Mirtazapine decreases stimulatory effects of reboxetine on cortisol, adrenocorticotropin and prolactin secretion in healthy male subjects. *Neuroendocrinology* **79**, 54-62 (2004).
137. Schatzberg,A.F. Pharmacological principles of antidepressant efficacy. *Hum. Psychopharmacol.* **17 Suppl 1**, S17-S22 (2002).
138. Sanchez,C. & Hyttel,J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol. Neurobiol.* **19**, 467-489 (1999).
139. Murck,H. [Atypical depression and related illnesses--neurobiological principles for their treatment with Hypericum extract]. *Wien. Med. Wochenschr.* **152**, 398-403 (2002).

140. Murck,H., Uhr,M., Schaffler,K. & Seibel,K. Effects of Hypericum extract (LI160) on the change of auditory evoked potentials by cortisol administration. *Neuropsychobiology* **50**, 128-133 (2004).

## 7 Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen

### 7.1 Abbildungen

Abb. 1-1: Regulation der Ausschüttung von Glucocorticoiden .....	16
Abb. 1-2: Modell der Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors.....	18
Abb. 1-3: Strukturelles und topologisches Model von Pgp.....	22
Abb. 1-4: Pumpmechanismus von P-Glykoprotein nach Borst P. 1999 .....	29
Abb. 1-5: Flippase-Mechanismus von P-Glykoprotein nach Borst P. 1999.....	29
Abb. 2-1 Das Calcein-AM Indikatorsystem.....	59
Abb. 2-2: EC-50 Bestimmung von Ivermectin und Verapamil .....	62
Abb. 2-3: Darstellung der Ergebnisse des Calcein-Assays.....	63
Abb. 2-4: Eichkurve Corticosteronassay .....	72
Abb. 3-1: Modulation von Pgp durch Verapamil und Probenecid in beiden Zellsystemen .....	80
Abb. 3-2: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt.....	81
Abb. 3-3: Modulation von Pgp durch Hyperforin-Na .....	82
Abb. 3-4: Modulation von Pgp durch Hypericin.....	82
Abb. 3-5: Modulation von Pgp durch Quercetin .....	83
Abb. 3-6: Modulation von Pgp durch Amitriptylin .....	86
Abb. 3-7: Modulation von Pgp durch Clomipramin.....	86
Abb. 3-8: Modulation von Pgp durch Opipramol .....	87
Abb. 3-9: Modulation von Pgp durch Citalopram .....	89
Abb. 3-10: Modulation von Pgp durch Fluoxetin .....	89
Abb. 3-11: Modulation von Pgp durch Reboxetin.....	90
Abb. 3-12: Modulation von Pgp durch Mirtazapin .....	92
Abb. 3-13: Modulation von Pgp durch Chlorpromazin .....	93
Abb. 3-14: Modulation von Pgp durch Clozapin.....	93
Abb. 3-15: Modulation von Pgp durch Haloperidol.....	94
Abb. 3-16: Modulation von Pgp durch Cortisol.....	96
Abb. 3-17: Modulation von Pgp durch Corticosteron .....	96
Abb. 3-18: Modulation von Pgp durch Progesteron .....	96
Abb. 3-19: Einfluß von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen.....	100

Abb. 3-20: Einfluß von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen auf den intrazellulären ATP-Spiegel in PBCEC-Zellen .....	100
Abb. 3-21: Einfluß von tricyclischen Antidepressiva auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen .....	101
Abb. 3-22: Einfluß von SSRIs und SNRIs auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen .....	102
Abb. 3-23: Einfluß von Antipsychotika auf den intrazellulären ATP-Spiegel in VLB-Zellen .....	103
Abb. 3-24: Gegenüberstellung ATP-Spiegel und Hemmung des Calcein-AM-Transports.....	104
Abb. 3-25: Potentielle zelltoxische Effekte von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen in VLB-Zellen.....	106
Abb. 3-26: Potentielle zelltoxische Effekte von Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffen in PBCEC-Zellen .....	106
Abb. 3-27: Western Blot von CEM- (rechts) und VLB-Zellen (links).....	108
Abb. 3-28: Basale Expression von Pgp in CEM- und VLB-Zellen .....	108
Abb. 3-29: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Johanniskrautbehandlung [µg/ml] (C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen).....	109
Abb. 3-30: Expression von Pgp nach Behandlung mit Johanniskrautextrakt (Lichtwer).....	109
Abb. 3-31: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Behandlung mit Hyperforin [µM] (C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen) .....	110
Abb. 3-32: Expression von Pgp nach Behandlung mit Hyperforin.....	110
Abb. 3-33: Western Blot von CEM- und VLB-Zellen nach Behandlung mit Quercetin [µM] (C = CEM-Zellen; V = VLB-Zellen) .....	111
Abb. 3-34: Expression von Pgp nach Behandlung mit Quercetin.....	111
Abb. 3-35: Expression von Pgp nach subchronischer Behandlung.....	115
Abb. 3-36: Corticosteronspiegel in Plasma und Gehirn bei Kontrollen mit und ohne Behandlung.....	116
Abb. 3-37: Korrelationen der Plasma- und Gehirnspiegel.....	117
Abb. 3-38: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Johanniskraut .....	118
Abb. 3-39: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Amitriptylin .....	119

Abb. 3-40: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Fluoxetin .....	120
Abb. 3-41: Corticosteronspiegel in Gehirn und Plasma nach Behandlung mit Mirtazapin .....	120
Abb. 3-42: Gesamtkorrelationen nach akuter (oben) und subchronischer (unten) Applikation .....	122

## **7.2 Tabellen**

Tabelle 1-1: Hauptsymptome und andere häufige Symptome von depressiven Störungen nach ICD10 .....	2
Tabelle 1-2: Akute Effekte und adaptive Veränderungen durch Antidepressiva nach Müller WE 2000 .....	5
Tabelle 1-3: Modulatoren von Pgp: Arzneistoffklassen .....	23
Tabelle 1-4: Nomenklatur der MDR Gene.....	24
Tabelle 1-5: Vorkommen und physiologische Funktion von Pgp .....	26
Tabelle 2-1: in dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe .....	41
Tabelle 2-2: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	51
Tabelle 3-1: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe in VLB-Zellen. ....	84
Tabelle 3-2: Modulation von Pgp durch Johanniskrautextrakt und dessen Hauptinhaltsstoffe in PBCEC-Zellen.....	85
Tabelle 3-3: Modulation von Pgp durch tricyclische Antidepressiva in VLB-Zellen.....	88
Tabelle 3-4: Modulation von Pgp durch tricyclische Antidepressiva in PBCEC-Zellen.....	88
Tabelle 3-5: Modulation von Pgp durch SSRIs und SNRIs in VLB-Zellen .....	91

Tabelle 3-6: Modulation von Pgp durch SSRIs und SNRIs in PBCEC-Zellen ...	91
Tabelle 3-7: Modulation von Pgp durch Tetracyclika in VLB-Zellen .....	92
Tabelle 3-8: Modulation von Pgp durch Antipsychotika in VLB-Zellen .....	94
Tabelle 3-9: Modulation von Pgp durch Antipsychotika in PBCEC-Zellen .....	95
Tabelle 3-10: Modulation von Pgp durch Glucocorticoide in VLB-Zellen .....	97
Tabelle 3-11: Modulation von Pgp durch Glucocorticoide in PBCEC-Zellen .....	98
Tabelle 3-12: Gewichtszunahme der einzelnen Behandlungsgruppen innerhalb der 14 täglichen Behandlung .....	114
Tabelle 3-13: Steigungen der einzelnen linearen Regressionen der Behandlungsgruppen nach akuter und subchronischer Behandlung .....	121
Tabelle 3-14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Amitriptylin .....	123
Tabelle 3-15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Fluoxetin .....	123
Tabelle 3-16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Johanniskrautextrakt .....	124
Tabelle 3-17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Behandlungsstudien mit Mirtazapin .....	124
Tabelle 4-1: Therapeutische Plasmakonzentration von verschiedenen Antidepressiva und Antipsychotika nach P. Baumann et al., Pharmacopsychiatry 2004; 37 (6): 243-265 .....	138

## Publikationen

Teile der Dissertation wurden vorab publiziert.

### Posterpräsentationen

Weber C.C., Kressmann S., Müller W.E.

*„Modulation of P-Glycoprotein by Antidepressants“*

Jahrestagung 2003 der DPhG, Oktober 2003, Würzburg

C. C. Weber, S. Kressmann, W. E. Müller

*„Inhibition of P-Glycoprotein by several antidepressants and antipsychotics“*

45. Frühjahrstagung der DGPT, März 2004, Mainz

C.C. Weber, S. Kressmann, G.P. Eckert, W.E. Müller

*„Modulation of P-Glycoprotein-Function and –Expression by St. John’s wort extract and its major constituents“*

46. Frühjahrstagung der DGPT, März 2005, Mainz

### Originalarbeiten

C.C. Weber, S. Kressmann, G. Fricker, W.E. Müller

*„Modulation of P-Glycoprotein Function by St John’s wort extract and its major constituents“*

Pharmacopsychiatry 2004; 37(6): 292-298

Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber CC, Eckert GP, Müller WE

*„Flavonoids and the aging brain“*

Journal of Physiology and Pharmacology 2005, 56 Suppl. 1: 23-36

C.C. Weber, S. Kressmann, M. Ott, G. Fricker, W.E. Müller

*„Inhibition of P-Glycoprotein function by several antidepressants may not contribute to clinical efficacy“*

Pharmacopsychiatry, 2005, in press



**Übersichtsarbeiten**

Claudia-Carolin Weber, Prof. Dr. Walter E. Müller

*„Arzneimittelinteraktionen: P-Glykoproteine – Schutzmechanismus mit Problemen“*

Der Hausarzt 2004, Nr. 17, Seite 74/75

Claudia-Carolin Weber, Prof. Dr. Walter E. Müller

*„Arzneistoffe und Nahrungsmittel: Interaktionen – Vorsicht vor Grapefruit!“*

Der Hausarzt 2005, Nr. 8, Seite 74/75

## **Danksagung**

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Walter E. Müller, der mir die Gelegenheit gegeben hat in seinem Arbeitskreis diese Arbeit anzufertigen und mir während der Durchführung stets führend und beratend zur Seite stand. Dankbar bin ich ebenfalls für die Ermöglichung der Teilnahme an Kongressen während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz danke ich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Kreßmann für die hervorragende Betreuung der ersten zwei Jahre meiner Arbeit, für stets aufmunternde Worte und vor allem für die vielen produktiven aber auch lustigen gemeinsamen Stunden im Labor.

Der Firma Lichtwer danke ich für die Bereitstellung des Johanniskrautextrakts LI160, für die Unterstützung der Arbeit sowie für die stets ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Fricker und Frau Melanie Ott danke ich für die Einführung in die Präparation von Schweinehirnkapillar-Endothelzellen und die Anleitung zu deren Kultivierung.

Herrn Prof. Dr. W. Beck und dessen Mitarbeitern aus Chicago möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung der Lymphoblastomzellen danken.

Ich danke dem Hessischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur für die Bewilligung des Promotionsstipendiums für Naturwissenschaftlerinnen.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Gunter P. Eckert für die tatkräftige Unterstützung bei den Behandlungsstudien.

Frau Dr. Gisela Holoubek, Frau Dr. Anne Eckert, Frau Dr. Uta Keil, Frau Astrid Bonert und Frau Isabel Scherping danke ich für die Einführung in verschiedene Methoden und die Hilfestellung bei dabei auftretenden Problemen.

Mein Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für die schöne Zeit im Labor sowie für wertvolle Tips und Hilfestellungen. Ganz besonders danke ich Frau Stefanie Schmitt-Schillig dafür, dass sie immer da war, wenn ich Hilfe, Aufmunterung oder einfach nette Gesellschaft und jemanden zum Reden brauchte.

Ich danke allen Freunden, die immer ein offenes Ohr für meine Geschichten rund um die Doktorarbeit hatten. An dieser Stelle geht mein besonderer Dank an Guido Kruse, der telefonisch stets für Problemlösungen aller Art eine große Hilfe war.

Meinen Eltern gilt ein ganz besonders herzliches Dankeschön für die Unterstützung, die sie mir während meiner gesamten Ausbildungszeit haben zukommen lassen – ohne ihre Hilfe wären weder Studium noch Promotion möglich gewesen. Danke, dass ich sowohl mit allen Problemen als auch mit allen freudigen Erlebnissen stets zu Euch kommen konnte.

Außerdem danke ich Tizita für das Korrekturlesen meiner Arbeit trotz stressiger Prüfungssituation, und dafür, dass sie immer für alles da war!

## Lebenslauf

Name: Weber  
Vorname: Claudia-Carolin  
Adresse: Fritzlarer Str. 16a  
60487 Frankfurt  
Geburtsdatum: 18.08.1975  
Geburtsort: Hagen (Westfalen)  
Eltern: Gisela Weber (Apothekerin)  
Bernd Weber (EDV-Kaufmann)  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Schul Ausbildung

08/1982 – 06/1986 Karl-Ernst-Osthaus Grundschule in Hagen  
08/1986 – 06/1995 Albrecht-Dürer Gymnasium in Hagen  
06/1995 Abitur mit Latinum

## Berufsausbildung

08/1995 – 03/1996 Pharmazeutisch-Technische Lehranstalt Hagen

## Studium

04/1996 – 09/2000 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
08/1998 erstes Pharmazeutisches Staatsexamen  
10/2000 zweites Pharmazeutisches Staatsexamen  
12/2001 drittes Pharmazeutisches Staatsexamen  
12/2001 Approbation als Apothekerin

## Praktische Tätigkeiten

09/1996 Famulatur in der Apotheke am Landgericht in Hagen  
09/1997 Famulatur in der Hohenzollern Apotheke in Hagen  
11/200 – 04/2001 Praktikum in der Rathausapotheke in Hagen  
05/2001 – 10/2001 Praktikum in der Apotheke der Rheinischen  
Landeskliniken in Bonn

**Promotion**

01/2002 - dato                      Anfertigung einer Promotionsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Walter E. Müller, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Biozentrum, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

**Kongressbesuche**

10/2003                              Jahrestagung 2003 der DPHG in Würzburg  
03/2004                              45. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz  
10/2004                              ZAFES Kick-off-Symposium "Lipid Signaling" in Frankfurt am Main  
03/2005                              46. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz

**Zusatzqualifikationen**

Seit 01/2002                      Lehrtätigkeit an der Universität Frankfurt:  
- im Rahmen der Seminare „Antinfektiva I: bakterielle Infektionskrankheiten“ und „Antinfektiva II: Tuberkulose und Malaria“ für Studenten des 7. Fachsemesters der Pharmazie und für Studenten der Fachrichtung Biochemie  
- im Rahmen des „Seminars zur Einführung in die Pharmakologie für Biochemiker und andere Naturwissenschaftler“ Betreuung der Vorlesung: „Antinfektiva“  
- im Rahmen des „Wahlpflichtfachs Pharmakologie“ Betreuung des Seminars „pharmakokinetische Arzneimittelinteraktionen“  
01/2002 – 03/2004              Kollegiat des Graduiertenkollegs „Arzneimittel – Entwicklung und Analytik“  
seit 01/2003                      Bestellung zum Mitglied einer Prüfungskommission für den Zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
12/2002 – dato                      Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation